

Victória de Oliveira Costa

Caracterização microbiológica de estirpes com suscetibilidade reduzida à colistina relacionadas à colonização comunitária do trato gastrointestinal na Região Metropolitana do Rio de Janeiro



**Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
OUTUBRO / 2022**

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob orientação da Profa. Dra. Renata Cristina Picão e coorientação de Gabriel Taddeucci Rocha.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

C837c Costa, Victoria de Oliveira  
Caracterização microbiológica de estirpes com suscetibilidade reduzida à colistina relacionadas à colonização comunitária do trato gastrointestinal na região metropolitana do Rio de Janeiro. / Victoria de Oliveira Costa. -- Rio de Janeiro, 2022.  
86 f.

Orientadora: Renata Cristina Picão.  
Coorientador: Gabriel Taddeucci Rocha.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. mcr. 2. resistência . 3. bacilos gram negativos. 4. colonização comunitária. I. Picão, Renata Cristina , orient. II. Rocha, Gabriel Taddeucci, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
 IMUNOLOGIA**

**ALUNO: Victória de Oliveira Costa**

DRE: 118029077

**BANCA EXAMINADORA:** Profa. Karla Rodrigues Miranda (Presidente)  
 Profa. Márcia Garnica  
 M.Sc. Luana Boff  
 Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (Suplente)

**Título da Monografia: “Caracterização microbiológica de estirpes com suscetibilidade reduzida à colistina relacionadas à colonização comunitária do trato gastrointestinal na região metropolitana do Rio de Janeiro”**

**Local: Sala D-27/ IMPPG / CCS / UFRJ**

**Data e hora de início: 24 de outubro de 2022 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,6 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 24 de outubro de 2022.

<p><b>NOTA</b></p> <p><u>10,0</u></p> <p><u>9,5</u></p> <p><u>9,5</u></p> <p>_____</p>	<p><b>Banca Examinadora:</b></p> <p><u>Karla Rodrigues Miranda</u>          Profa. Karla Rodrigues Miranda</p> <p><u>Márcia Garnica</u>          Profa. Márcia Garnica</p> <p><u>Luana Boff</u>          M.Sc. Luana Boff</p> <p>_____</p> <p>Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza</p>
<p><b>Aluno:</b></p>	<p><u>Victória de Oliveira Costa</u>          Victória de Oliveira Costa</p>
<p><b>Orientador:</b></p>	<p><u>Renata Cristina Picão</u>          Profa. Renata Cristina Picão / Coorientador: Gabriel Taddeucci Rocha</p>
<p><b>Coordenador de TCC</b></p>	<p><u>Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho</u>          Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho</p>

Dedico esse trabalho a Ana Claudia e Dona Nilza, uma mãe e avó maravilhosas. Sem vocês eu não seria nada. Eternamente amores da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me permitido chegar até aqui, sempre me dando força e guiando. Agradeço imensamente a toda a minha família. Sobretudo a minha irmã Giovana, por sempre topar e aturar o treino de vários seminários e apresentações. Obrigada por ser tão companheira, minha força vem de você. Agradeço a todo o apoio de meu pai, que sempre fez o impossível para criar a mim e minha irmã desde o falecimento de minha mãe. Agradeço ao meu irmão mais velho, Cristiano, por todos os conselhos e carinho. E principalmente a minha mãezinha, Ana Claudia, que apesar de não estar mais entre nós, continua a me iluminar onde quer que eu passe e está muito orgulhosa de quem me tornei e tudo que conquistei.

Agradeço imensamente ao meu namorado Luã que nunca largou minha mão. Passou comigo por muitos perrengues desde a minha entrada nessa universidade linda, sempre me apoiando e aconselhando. Inclusive, foi a pessoa que me apresentou tudo na UFRJ, sou imensamente grata! Obrigada pelos abraços, beijos e conselhos em situações de tristeza e felicidade. Você possui um papel muito importante nessa grande conquista, te amo. Agradeço também a todos os meus tios, principalmente ao meu padrinho, que se tornou uma grande inspiração e por todos os conselhos incríveis. Agradeço a minha avó Loides e meu avô Sérgio por todo o carinho e amor. E principalmente aos meus avós Celedônio e Nilza que para sempre estarão em meu coração.

Não poderia deixar de agradecer ao querido L IMM, por me acolher tão carinhosamente. Todos possuem um lugar muito importante em minha trajetória. Renata e Gabriel, sobretudo, possuem um lugar único em meu coração. Vocês enriqueceram minha trajetória acadêmica de forma surpreendente. Gostaria de ter a metade da sabedoria de vocês quando crescer. Obrigada por toda a ajuda conselhos e paciência. Não tenho palavras que possam expressar quão incríveis vocês são, sou imensamente grata. Obrigada por tudo. Obrigada Sarinha, Jessica e Carlos por toda ajuda no laboratório, companhia e boas risadas. São pessoas tão incríveis que em poucos meses já se tornaram meus grandes amigos, Amo vocês.

Não poderia deixar de agradecer a essa universidade maravilhosa. Obrigada UFRJ por tanto. Obrigada por me garantir amizades incríveis. Juliana, Vitória, Mari, Bianca, Jessica. Minhas eternas amigas de disciplinas e da vida. Sem vocês, eu não teria passado em metade dos perrengues e matérias. Agradeço por todas as experiências que vivi com cada uma.

Mulheres incríveis que sinto um imenso orgulho quando olho para trás e vejo como amadurecemos e evoluímos. Para sempre vou levarei vocês em minhas lembranças mais felizes, obrigada por tanto!

Gostaria de mencionar em especial Adriane e Ana Clarisse. Vocês são os melhores presentes que eu poderia ganhar. Obrigada por tornarem essa trajetória leve e divertida. Adriane por ter sido minha companheira de laboratório a tanto tempo, sempre a disposição para escutar meus desabafos e sempre tão compreensiva, obrigada por tudo. Ana Clarisse, mulher de garra! Sua força me inspirou muito, sabia? Obrigada por ter feito parte dessa trajetória e por ter me apoiado tanto. Amo muitíssimo vocês.

Agradeço imensamente aos professores do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, por todo conhecimento e por terem contribuído para minha formação acadêmica e profissional. À banca avaliadora Karla, Márcia, Luana e Sérgio. Obrigada por compartilharem seus conhecimentos, auxiliando na construção deste estudo e tornando-o ainda melhor.

Eu não poderia deixar de agradecer aos meus gatos, ou melhor, meus filhos. Lion, Zatará, Peta, Peto, Evinha e Pudim, obrigada por todas as noites de companheirismo, meus eternos amores.

## RESUMO

Victória de Oliveira Costa

### **Caracterização microbiológica de estirpes com suscetibilidade reduzida à colistina relacionadas à colonização comunitária do trato gastrointestinal na região metropolitana do Rio de Janeiro.**

**Orientadora: Renata Cristina Picão**

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um grave problema de saúde pública, pois diminui as opções de tratamento para combater infecções. Os bacilos gram-negativos (BGN) compõem um grupo de espécies com potencial patogênico, responsáveis pela maioria das infecções relacionadas à assistência à saúde. A emergência de cepas MDR (*MultiDrug Resistant*), incluindo as resistentes aos carbapenêmicos, fez das polimixinas fármacos importantes em um cenário com poucas opções terapêuticas. Até 2015, apenas resistência adaptativa às polimixinas era observada em amostras clínicas. No entanto, em 2016, foi descrito o gene *mcr-1*, mediado por plasmídeo e capaz de conferir resistência a essa classe de antimicrobianos. Desde então, outras variantes foram descritas. Apesar do protagonismo de MDR em ambientes de saúde, o gene *mcr* já foi relatado em BGN isolados de animais, alimentos e meio ambiente. Sabe-se, portanto, que essas cepas estão presentes no ambiente, e o ser humano, em contato com o ambiente, pode servir como reservatório e veículo para a resistência alcançar os hospitais. Nosso trabalho buscou caracterizar a colonização comunitária por BGN com baixa susceptibilidade à colistina, sobretudo a participação de genes *mcr* neste cenário. Para isto, *swabs* retais de 100 indivíduos sem histórico de internação recente foram coletados. Os espécimes foram cultivados em TSA para controle de viabilidade celular e, em seguida, sob pressão seletiva pela colistina; e as colônias recuperadas foram identificadas por MALDI-TOF MS. As espécies que não apresentaram resistência intrínseca, foram analisadas quanto ao fenótipo de resistência à colistina pelo teste PoliNP e antibiograma. Para confirmação do genótipo, as amostras foram submetidas à PCR para detecção das variantes de *mcr*, seguido de sequenciamento do produto amplificado. Os resultados revelaram que a ocorrência de colonização comunitária por BGN com baixa susceptibilidade à colistina de natureza adquirida foi de 6,25% de acordo com o teste fenotípico, enquanto no teste de susceptibilidade apenas duas amostras apresentaram resistência à tetraciclina. Não foi encontrada nenhuma variante *mcr* nas amostras estudadas. Sendo assim, os genes plasmidiais *mcr* pesquisados não apresentam papel relevante na colonização e disseminação comunitária de BGN nos indivíduos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro estudados. No entanto, mais da metade das amostras apresentaram fenótipo positivo quanto à baixa susceptibilidade ao fármaco. Portanto, mais estudos são necessários para entender o mecanismo envolvido e qualificar o papel de BGN na disseminação de mecanismos de resistência à colistina entre os cidadãos da Região Metropolitana da cidade do Rio de Janeiro.

**Palavras-chave:** *mcr*, resistência, bacilos gram-negativos, colonização comunitária.



## ABSTRACT

Victoria de Oliveira Costa

**Caracterização microbiológica de estirpes com suscetibilidade reduzida à colistina relacionadas à colonização comunitária do trato gastrointestinal na região metropolitana do Rio de Janeiro.**

**Orientadora: Renata Cristina Picão**

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Bacterial resistance to antimicrobial agents is a serious public health problem as it limits the treatment options against infections. Gram-negative bacilli (GNB) comprise a group of species with pathogenic potential, responsible for most healthcare-associated infections. The emergence of MDR (multidrug-resistant) strains, including those resistant to carbapenems, made polymyxins important drugs in a scenario with few therapeutic options. Until 2015 only adaptive resistance to polymyxins was observed in clinical samples. However, in 2016, the plasmid-mediated *mcr-1* gene was described as capable of conferring resistance to this class of antimicrobials. Since then, other variants have been described. Despite the role of MDR in healthcare settings, the *mcr* gene has been reported in GNB isolated from animals, food and the environment. Considering the environmental dissemination of antimicrobial-resistant bacteria humans may become colonized upon contact with the contaminated environment, serving as a reservoir and vehicle for resistance's entry into hospitals. We aimed at characterizing the community-acquired colonization by GNB with decreased susceptibility to colistin, especially regarding the participation of *mcr* genes in this scenario. For this, rectal swabs from 100 individuals with no history of recent hospitalization were collected. The specimens were cultured in TSA to control for cell viability and then under selective pressure by colistin. Colonies recovered were identified using MALDI-TOF MS. The bacterial species known to be intrinsically susceptible to colistin were analyzed for the phenotype of resistance to this antimicrobial agent using the PolyNP test. The antimicrobial susceptibility profiles of these isolates were also assessed. Detection of *mcr* variants was carried out by PCR, followed by amplicon sequencing. The occurrence of community-acquired colonization by GNB with decreased susceptibility to colistin was 6,25% considering the phenotypic test results. Only two isolates also showed resistance to tetracycline. No *mcr* variant was found in isolates studied. Therefore, the plasmid-mediated *mcr* varied surveyed do not seem to play a relevant role in community-acquired colonization by GNB showing decreased susceptibility to colistin in the studied sample of individuals from Rio de Janeiro's Metropolitan Region. However, more than half of isolates recovered showed a positive phenotype regarding decreased susceptibility to this drug. More studies are needed to understand the mechanism involved in order to qualify the role of GNB in the dissemination of colistin resistance determinants among citizens of the Rio de Janeiro's Metropolitan Region.

Keywords: *mcr*, resistance, gram-negative bacilli, community colonization.

## RESUMO PARA LEIGOS

Victória de Oliveira Costa

**Caracterização microbiológica de estirpes com suscetibilidade reduzida à colistina relacionadas à colonização comunitária do trato gastrointestinal na região metropolitana do Rio de Janeiro.**

**Orientadora: Renata Cristina Picão**

**Resumo simplificado da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Nossa pesquisa observou que seis entre 100 pessoas que vivem na Região Metropolitana do Rio de Janeiro possuem bactérias no intestino capazes de resistir ao antibiótico colistina. Esse estudo contou com a participação de indivíduos sem histórico de internação recente atendidos na emergência de um hospital público no município de Niterói; e que aceitaram participar do estudo com a doação de um *swab* retal. Após a coleta deste *swab*, foi investigado se as bactérias presentes ali eram capazes de crescer na presença do antibiótico colistina. Depois, cada bactéria obtida foi analisada quanto à presença de um gene chamado *mcr*, capaz de promover essa resistência. Nenhuma das amostras testadas apresentou resultados positivos neste teste; no entanto, a pesquisa destes genes apresenta limitações e, por isso, mais investigações são necessárias para saber qual mecanismo está envolvido com a resistência desses organismos. A colistina, apesar da sua toxicidade, tem grande importância para a medicina humana por ser um dos últimos recursos para tratamento de infecções por bactérias resistentes aos antibióticos de primeira escolha, aqueles mais utilizados. O impacto da presença de bactérias capazes de sobreviver mesmo em contato com este antibiótico no intestino de pessoas fora do ambiente hospitalar ainda não é muito entendido; entretanto, pode significar um risco grave em pessoas internadas. Nosso estudo chama a atenção, sobretudo, para o potencial do intestino de pessoas fora dos ambientes hospitalares, com a presença dessas bactérias resistentes, servirem como reservatórios e veículo de bactérias resistentes para as instituições de saúde.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mecanismo de ação da colistina em bactérias gram-negativas.....	29
<b>Figura 2</b> - Caminhos de regulação de modificações adaptativas de LPS.....	33
<b>Figura 3</b> - Fluxograma do processamento dos espécimes clínicos e resultados obtidos nas culturas.....	52
<b>Figura 4</b> - Gel referente a corrida <i>simplex</i> para <i>mcr-8</i> .....	57

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Iniciadores utilizados na reação de PCR <i>multiplex</i> , para a detecção dos genes <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> , <i>mcr-4</i> , <i>mcr-5</i> , <i>mcr-6</i> , <i>mcr-7</i> , <i>mcr-8</i> , <i>mcr-9</i> e <i>mcr-10</i> .....	50
<b>Tabela 2</b> - Dados de identificação de cada amostra estudada.....	53
<b>Tabela 3</b> - Amostras estocadas de acordo com cada swab processado.....	54
<b>Tabela 4</b> - Resultados do Teste PoliNP.....	55
<b>Tabela 5</b> - Dados referentes ao resultado da PCR multiplex para pesquisa de genes <i>mcr</i> .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC	Acetiltransferase
AAD	Adeniltransferase
AMEs	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
APH	Fosfotransferase
BGN-RA	Bacilo gram-negativo resistente aos antimicrobianos
BGN	Bacilo gram-negativo
BLASTn	<i>Basic local alignment Search Tool nucleotide</i>
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDC	do inglês, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLSI	do inglês, <i>The Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
CMS	Colistimetato de sódio
CS	Sulfato de colistina
DMM	Departamento de Microbiologia Médica
DNA	do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ECDC	do inglês, <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
ESBL	do inglês, <i>Extended spectrum beta-lactamases</i>
EUA	Estados Unidos da América
GRA	Genes de Resistência a Antimicrobianos
HGT	do inglês, <i>Horizontal Gene Transfer</i>
IAC	Infecção adquirida na comunidade
IBCCF	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
ICS	Infecção de corrente sanguínea
IMPG	Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
ITUs	Infecções do trato geniturinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
L-Ara4N	4-amino-L-arabinose
LIMM	Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica
LPS	Lipopolissacarídeo
LRA	Lesão Renal Aguda
MALDI-TOF MS	do inglês, <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry</i>
MFStransporter	do inglês, <i>Major facilitator superfamily</i>
Mtase	Metiltransferases
NHSN	do inglês, <i>National Healthcare Safety Network</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAC	Pneumonia adquirida na comunidade
PBPs	Proteínas de ligação à penicilina
PCR	do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
PEtN	Fosfoetanolamina
QRDR	Região determinante de resistência a quinolona
RJ	Rio de Janeiro
rRNA	do inglês, <i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
SAP	do inglês, <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGI	Trato gastrointestinal
TSA	do inglês, <i>Tryptic Soy Agar</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia

UFRJ  
UTI

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Unidade de Tratamento Intensivo

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	7
<b>ABSTRACT</b>	8
<b>RESUMO PARA LEIGOS</b>	9
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	10
<b>LISTA DE TABELAS</b>	11
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	12
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 Apresentação do problema	1
1.2 A resistência bacteriana	2
1.3 Bacilos gram-negativos	6
1.4 Opções terapêuticas e mecanismos de resistência emergentes em BGN	8
1.5 Polimixinas	12
1.6 O uso e a resistência à colistina	15
1.7 Distribuição e transmissão de genes <i>mcr</i> e BGN multirresistente pelo ambiente	20
1.8 Colonização comunitária e disseminação de BGN multirresistentes	24
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	27
<b>3. OBJETIVO</b>	28
<b>3.1 Etapas</b>	28
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	29
4.1 Desenho do estudo	29
4.2 População incluída no estudo	29
4.3 Obtenção dos espécimes clínicos	30
4.4 Processamento dos espécimes clínicos	30
4.5 Identificação das amostras	30
4.6 Teste rápido de Polimixina NP	31
4.6.1 Preparo das soluções	31
4.6.2 Distribuição das soluções e dos inóculos bacterianos na placa de 96 poços	32
4.6.3 Leitura do teste Polimixina NP	33
4.7 Antibiograma	33
4.8 Detecção dos genes <i>mcr</i>	34
<b>5. RESULTADOS</b>	37
5.1 Obtenção e processamento dos espécimes clínicos	37
5.2 Identificação das amostras	38

5.3 Teste Rápido de Polimixina NP	39
5.4 Antibiograma	40
5.5 Pesquisa por genes <i>mcr</i>	41
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>43</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>48</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>49</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>63</b>
9.1. Anexo 1	63
9.2. Anexo 2	66



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Apresentação do problema

O trato gastrointestinal (TGI) é composto por diferentes órgãos que desempenham, como principal função, a digestão e absorção dos nutrientes consumidos (Meerveld, Johnson e Grundy, 2016). Entre os microrganismos colonizadores do TGI estão cerca de 100 trilhões de bactérias, fungos e vírus, entre outros que, juntos, compõem a microbiota anfibiótica, sobretudo intestinal (Yang e Kweon, 2016). Além de influenciar positivamente a metabolização dos alimentos no organismo do hospedeiro através de sua capacidade enzimática, a microbiota intestinal é responsável por induzir o desenvolvimento do sistema imunológico da mucosa, graças ao constante contato das células epiteliais intestinais com esses microrganismos. A microbiota ainda está envolvida na síntese de vitaminas importantes para o desenvolvimento do organismo; ademais, pode atuar na diminuição e proteção da colonização e translocação de patógenos (Gallo *et al.*, 2016).

Os bacilos gram-negativos (BGNs) destacam-se entre as espécies bacterianas envolvidas na colonização do TGI por representarem um dos principais grupos bacterianos com maiores taxas de aquisição e desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (Guarner e Malagelada, 2003). São bactérias que frequentemente causam infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) em humanos (Peleg *et al.*, 2012), dentre elas: infecções do trato geniturinário (ITUs) (McLellan e Hunstad, 2016), infecções de corrente sanguínea (ICS) (Timsit *et al.*, 2020), infecções do trato respiratório e infecções de sítio cirúrgico (Rosenthal *et al.*, 2011); além de serem capazes de causar infecções comunitárias. O rápido aumento de resistência bacteriana pelos BGNs, bem como a eficiente troca de determinantes genéticos para a resistência, torna-os uma séria ameaça à saúde humana (Ventola, 2015).

Em 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS) destacou os BGNs como grupo de prioridade crítica para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (WHO, 2017). Um relatório mais atualizado sobre as ameaças acerca do uso de antibióticos e a emergência da resistência nos Estados Unidos da América (EUA), publicado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC 2019), reforça o aumento da ocorrência e disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos. Nele, alguns grupos de patógenos foram analisados

quanto ao seu nível de ameaça e separados em grupos preocupantes, sérios e urgentes. Os parâmetros utilizados para a avaliação da ameaça envolveram fatores como: impacto clínico, impacto econômico, incidência de infecções, projeção de incidência nos próximos 10 anos, transmissibilidade e disponibilidade de antimicrobianos eficazes. De acordo com esses parâmetros, as enterobactérias foram classificadas como ameaças urgentes e sérias de acordo com o mecanismo de resistência apresentado. Além disso, o gênero *Acinetobacter* e a espécie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* foram classificados como ameaças urgente e séria, respectivamente (CDC, 2019).

A ausência de antimicrobianos eficientes no combate de infecções por esses microrganismos multirresistentes a várias classes de antimicrobianos fez das polimixinas importantes fármacos em um cenário com poucas opções terapêuticas (Tran *et al.*, 2016). Apesar do sucesso da colistina no combate a microrganismos, o seu uso fez com que a comunidade científica voltasse o olhar para a resistência antimicrobiana às polimixinas, até então descrita apenas como de origem cromossômica (Moffatt, Harper e Boyce, 2019). No entanto, a preocupação quanto a resistência à colistina se agravou a partir da detecção de um gene de origem plasmidial conhecido como *mcr-1* (*mobile colistin resistance*), responsável por garantir resistência às polimixinas, com alto potencial de transmissão horizontal (HGT) entre as diferentes espécies de BGN resistentes aos antimicrobianos (BGN-RA) (Yun Liu *et al.*, 2015). Até o momento, outras variantes de *mcr* foram descritas (*mcr-1* ao *mcr-10*), detectadas em diferentes nichos e regiões do mundo, incluindo em humanos, animais, produtos alimentícios e no ambiente (Nang *et al.*, 2019). No entanto, há uma carência de estudos no Brasil que visem detectar a prevalência de BGN carreadores de genes *mcr* de origem plasmidial colonizando os seres humanos.

## 1.2 A resistência bacteriana

A descoberta dos antibióticos foi um marco na história da humanidade, graças à sua capacidade em combater infecções bacterianas — das mais simples às letais — elevando rapidamente a expectativa de vida humana (Fleming, 1929 *apud* Hutchings *et al.*, 2019). No entanto, seu uso contínuo fez emergir a resistência bacteriana, considerada um grave problema de saúde pública, visto que contribui com a ineficácia do tratamento de infecções com antimicrobianos (Lobanovska e Pilla, 2017).

Muito antes da medicina conhecer e utilizar esses medicamentos no tratamento de doenças, os antibióticos e vários determinantes de resistência já estavam presentes no ambiente, sendo, portanto, considerados fenômenos naturais (Davis, 2013). Neste contexto, os microrganismos produzem substâncias antimicrobianas como meio de garantir vantagens na captura de nutrientes, crescimento e conquista do ambiente sobre seus concorrentes (Netzker *et al.*, 2018). As concentrações dessas substâncias expressas naturalmente no meio ambiente são baixas, não alcançando uma concentração mínima para iniciar de fato uma atividade antibiótica (Linares *et al.*, 2006). Ainda assim, mesmo em concentrações muito baixas, os organismos produtores dessas substâncias necessitam de mecanismos que garantam que apenas os seus concorrentes sejam afetados. A plasticidade genômica desses organismos favorece a transmissão desses genes dos produtores de antibióticos a outros hospedeiros (Berkner, Konradi e Schonfeld, 2014).

Com o início da Era dos antibióticos, a disseminação de resíduos dessas substâncias tem aumentado, bem como de genes de resistência, sendo descritos em todos os continentes da Terra (Yang *et al.*, 2018). O ser humano contribui diretamente para a evolução da resistência bacteriana, principalmente a partir do uso de antimicrobianos de forma contínua. A agricultura possui grande influência sobre o aumento da taxa de resistência devido ao uso de elevadas quantidades de antimicrobianos como medida preventiva às infecções bacterianas em animais, além de ser usado, em algumas regiões, como meio de promover o crescimento e desenvolvimento de bovinos e aves (Wegener, 2003). Mesmo no combate às infecções facilmente tratáveis, a presença de antimicrobianos leva à pressão seletiva sobre espécies bacterianas que constituem o microbioma de diferentes compartimentos ambientais, favorecendo a seleção de organismos resistentes (Berkner, Konradi e Schonfeld, 2014).

Vale informar que, uma vez consumidos pelo ser humano ou por animais, os antimicrobianos não deixam de existir. Após serem metabolizados, seus produtos podem permanecer durante anos no meio ambiente (Kümmerer, 2001). Esses metabólitos muitas vezes retêm alguma atividade antimicrobiana e, assim, podem contribuir com a emergência da resistência devido à baixa eficiência ou incapacidade dos sistemas de tratamento de esgoto na remoção desses resíduos farmacêuticos (Rodriguez-mozaz *et al.*, 2020). Além disso, muitas vezes o esgoto é liberado no meio ambiente sem tratamento algum, levando ao acúmulo de compostos antimicrobianos no lodo de esgoto ou matrizes aquáticas, principalmente em cidades com infraestrutura de saneamento precária, como é o caso de muitos municípios do estado do Rio de Janeiro (Ventura, 2017).

O lodo gerado no processo final de tratamento de esgoto muitas vezes é utilizado como fertilizante, que também ocorre com os excrementos gerados por animais. Devido ao seu uso como adubo em solos de plantações de vegetais pode haver contaminação cruzada pelo consumo desses alimentos crus pelos seres humanos e, desta forma, contribuir positivamente para a aquisição e disseminação de genes resistência (Berkner, Konradi e Schonfeld, 2014; Pan e Chu, 2018; Zeng, Sun e Zhu, 2019; Cheng *et al.*, 2020).

A resistência bacteriana leva a consequências diretas à saúde, refletidas pelo aumento da taxa de morbidade e mortalidade de infecções ocasionadas pela limitação das opções de tratamento. Desta forma, infecções bacterianas que, a priori, seriam facilmente tratadas, passam a causar mais complicações (Frieri, Kumar e Boutin, 2017). Outros prejuízos à saúde também podem ser observados como reflexo do aumento da taxa de resistência, como a maior necessidade de cuidados intensivos e procedimentos invasivos em pacientes internados, além do risco de pacientes imunocomprometidos sofrerem infecções secundárias por espécies bacterianas resistentes. Além disso, a resistência bacteriana contribui negativamente para questões econômicas devido aos elevados custos de tratamentos ocasionados pelo período prolongado de internação e o custo elevado de medicamentos, insumos e mão-de-obra qualificada para atuar no combate de infecções multirresistentes (Friedman, Temkin e Carmeli, 2015).

A resistência aos antimicrobianos pode ser classificada em duas formas: intrínseca e adquirida, que abrange as modificações adaptativas (Arzanlou, Chai e Venter, 2017). A resistência intrínseca geralmente está associada às características estruturais e fisiológicas de um microrganismo que impedem a ação do antimicrobiano. Por exemplo, as bactérias gram-negativas naturalmente possuem resistência a alguns antimicrobianos, como eritromicina, clindamicina e vancomicina, graças à presença da membrana externa (Anvisa, 2007; Zgurskaya, López e Gnanakaran, 2015). A membrana externa é composta por uma bicamada assimétrica constituída por fosfolípidios localizados no folheto interno e moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) presentes no folheto externo (Delcour, 2008). A presença do LPS nessa membrana garante a sua maior estabilidade, o que impede a difusão passiva de algumas classes de antimicrobianos de caráter hidrofóbico. Além disso, a presença de poros e canais específicos limitam por tamanho a passagem de outros compostos (Nikaido, 2003).

Algumas espécies bacterianas ainda são capazes de expressar de maneira intrínseca bombas de efluxo responsáveis por garantir a não susceptibilidade a muitas classes de antimicrobianos através de seu efluxo para o meio extracelular, como é o caso de *P.*

*aeruginosa* (Lomovskaya *et al.*, 2006). Ainda existe a produção intrínseca de enzimas que modificam as drogas, razão pelo qual *K. pneumoniae* resiste a ampicilina através do gene blaSHV cromossômico e natural da espécie (Fu *et al.*, 2007). Por fim, a ausência de alvo do antimicrobiano também pode ser classificado como mecanismo intrínseco. Neste caso, tem-se como exemplo o antimicrobiano daptomicina, eficaz no combate a algumas bactérias gram-positivas, no entanto, sua ação é reduzida frente às bactérias gram-negativas (Randall *et al.*, 2013). Isto porque a daptomicina possui como alvo a membrana citoplasmática, utilizando como meio de inserção moléculas de  $Ca^{2+}$ , ocasionando a despolarização da membrana bacteriana, porém, bactérias gram-negativas, possuem uma proporção menor de fosfolipídeos aniônicos comparados às bactérias gram-positivas, tendo baixa susceptibilidade ao fármaco (Arzanlou, Chai e Venter, 2017).

A resistência adquirida ocorre quando um microrganismo previamente suscetível ao antimicrobiano passa a desenvolver mecanismos que garantem sua resistência. Esses mecanismos podem surgir como consequência da modulação de genes intrínsecos, também conhecido como resistência adaptativa, como respostas a situações de estresse através da expressão gênica e mudanças fenotípicas, ou através da aquisição de material genético transferidos de forma horizontal (Arzanlou, Chai e Venter, 2017). Apesar de pouco compreendido, a resistência adaptativa é conhecida há décadas, quando observações iniciais foram realizadas através de incubação *in vitro* de um microrganismo em meio de cultura suplementado com baixa concentração de antibiótico, o que não somente tornou as células mais resistentes à exposições subsequentes da droga, bem como a outras classes diferentes do antimicrobiano (Fernández, Breidenstein e Hancock, 2011). Outros fatores podem influenciar no desenvolvimento adaptativo de resistência, como por exemplo, a formação de biofilmes, que são comunidades compostas por várias espécies bacterianas ligadas a uma superfície e envoltas por matriz polimérica, dificultando o acesso e ação dos antimicrobianos, o que leva à falha terapêutica (Van Acker e Coenye, 2016).

Ademais, existe a resistência adquirida que pode surgir a partir da mutação em genes cromossômicos ou da aquisição de material genético exógeno, originalmente de outro microrganismo que contenham genes capazes de conferir resistência bacteriana e que são propagados através da HGT (Aleksun e Levy, 2007). Tal transferência pode se dar pela ação de elementos genéticos móveis, como plasmídeos; transpósons; bacteriófagos; e vesículas extracelulares; ou pela captação de DNA livre no ambiente (Levy e Marshall, 2004; Dell'Annunziata *et al.*, 2021). Os mecanismos bioquímicos da resistência podem envolver (i)

a modificação ou inativação do antimicrobiano, (ii) a modificação do alvo do antimicrobiano, (iii) o efluxo do antimicrobiano e (iv) a redução da captação do fármaco (Arzanlou, Chai e Venter, 2017). Em muitos casos, há uma combinação desses diferentes mecanismos e, assim, resulta o alto nível de resistência a determinados antimicrobianos (Davies e Davies, 2010). Além disso, a transferência desses genes não está restrita às bactérias pertencentes ao mesmo gênero, ocorrendo também entre espécies diferentes ou mesmo gêneros bacterianos distintos (Courvalin, 1994).

Diante dos inúmeros problemas gerados à saúde pelos microrganismos resistentes a múltiplos antimicrobianos, em 2017 a OMS publicou um Plano de Ação Global para o enfrentamento à resistência aos antimicrobianos com o objetivo de assegurar as possíveis formas de combate às bactérias resistentes, servindo como guia para diminuir o avanço da resistência aos antimicrobianos em diferentes países. Dentre as medidas propostas, há o rápido e preciso diagnóstico para o tratamento de pacientes; estudos de vigilância e pesquisa sobre a incidência, prevalência e ocorrência dos patógenos e padrões geográficos capazes de promover o monitoramento das intervenções e políticas públicas voltadas à saúde (WHO, 2017).

### 1.3 Bacilos gram-negativos

Os BGNs formam um diverso grupo bacteriano heterogêneo capaz de colonizar o TGI de humanos e animais, entre outros compartimentos, como matrizes aquáticas, solo e vegetais (Trabulsi, 2015; Oliveira e Reygaert, 2021). Dentro desse grupo, encontram-se ordens bacterianas de grande importância clínica, como *Enterobacterales*, *Pseudomonadales* que abrange gêneros como *Acinetobacter* e *Pseudomonas*, *Aeromonadales*, *Burkholderiales* e *Xanthomonadales* (Anvisa, 2008; Trabulsi, 2015, Adeolu *et al.*, 2016).

Os BGNs são frequentemente classificados em fermentadores e não fermentadores da glicose. Dentre os fermentadores, destacam-se principalmente à família *Enterobacteriaceae*, pertencente à ordem *Enterobacterales*, por possuir destaque na medicina humana, e é composta por espécies anaeróbicas facultativas, podendo ser móveis, com a presença de flagelos peritríquios, ou imóveis. Além disso, são cultiváveis em meios de cultura ricos como ágar Sangue e em meios seletivos como o ágar MacConkey. Não esporulam, são catalase-positivos, oxidase-negativos e, em sua maioria, são capazes de reduzir nitrato a nitrito (Brenner e Farmer, 2005; Anvisa, 2008; Murray, 2014).

Com base em estudos filogenéticos e características moleculares, a ordem *Enterobacteriales* pode ser dividida em sete famílias, são elas: *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* e *Budviciaceae* (Adeolu *et al.*, 2016). Os membros da família *Enterobacteriaceae* são, em sua maioria, comensais ao hospedeiro humano, mas em determinadas situações podem ocasionar infecções de caráter oportunista. Algumas espécies de enterobactérias como *Salmonella* spp. e diferentes sorotipos de *Escherichia coli* são consideradas patógenos devido à sua alta prevalência na etiologia de infecções gastrointestinais (Shinohara *et al.*, 2008; Croxen *et al.*, 2013). Ademais, muitos outros gêneros da família *Enterobacteriaceae* se destacam devido à sua importância clínica, são eles: *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp. e *Shigella* spp. (Anvisa, 2008).

Existem ainda os BGNs não fermentadores de glicose, característicos por serem oxidases-positivos, móveis e considerados oportunistas, com grande importância clínica em infecções adquiridas em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI). Dentre os principais gêneros bacterianos neste grupo capazes de causar infecções, destacam-se: *Pseudomonas* spp. da família *Pseudomonadaceae* e ordem *Pseudomonadales*, *Acinetobacter* spp. da família *Moraxellaceae* e ordem *Pseudomonadales*, *Burkholderia* spp. da família *Burkholderiaceae* e ordem *Burkholderiales*, *Stenotrophomonas* spp. da família *Xanthomonadaceae* e ordem *Xanthomonadales* e *Elizabethkingia* spp. pertencente a família *Flavobacteriaceae* e ordem *Flavobacteriales* (Trabulsi, 2015; Parte *et al.*, 2020). Por constituírem um grupo heterogêneo de bactérias oportunistas e patogênicas, os BGNs estão frequentemente associados às IRAS, incluindo pneumonias, ITUs, infecções de corrente sanguínea (ICSs) e infecções de sítios cirúrgico (Mehrad *et al.*, 2015). Mesmo que a maior prevalência de infecções causadas por esses organismos seja no âmbito hospitalar, também são considerados importantes agentes de infecções na comunidade.

Um relatório realizado nos EUA buscou descrever os patógenos comuns e padrões de resistência antimicrobiana para IRAS que ocorreram entre 2015 e 2017 e foram reportados à Rede Nacional de Segurança em Saúde (NHSN) do CDC. Dentre os anos analisados, foram notificados 5.626 estabelecimentos de Saúde de IRAS em adultos, totalizando 311.897 IRAS e 356.633 patógenos. Infecções no sítio cirúrgico contribuíram com a maior porcentagem de patógenos (43%), seguidas de infecções do trato urinário associadas a cateter (29%), infecções da corrente sanguínea associadas à linha central (25%) e Pneumonia associada à ventilação (3%). Os patógenos mais comuns em todas as IRAS foi *E. coli* constituindo quase

18% dos patógenos relatados. O segundo e terceiro patógenos mais comumente encontrados foram respectivamente *Staphylococcus aureus* (12%) e *Klebsiella spp* (9%). Além disso, *E. coli*, *Klebsiella spp.* e *P. aeruginosa* foram as três mais frequentemente relacionadas às ITU associadas a cateter (Weiner-Lastinger *et al.*, 2019).

No Brasil, um estudo de vigilância investigando IRAS do tipo ICS, em pacientes pediátricos brasileiros, realizado em 16 hospitais das cinco regiões brasileiras (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul) de 2007 a 2010, relatou que cerca de 49% das ICS foram causadas por bactérias gram-negativas, dentre elas, *Klebsiella spp.* e *Acinetobacter spp.* (Pereira *et al.*, 2013). Mais tarde, em 2016, um novo estudo realizado no Brasil relatou cerca de 51,2% de prevalência de IRAS em 28 UTIs de 12 regiões do estado de Minas Gerais. De acordo com o estudo, as enterobactérias foram as responsáveis por 23,4% de ICS e 47,6% dos casos de ITU (Braga *et al.*, 2018).

Apesar da alta prevalência, os BGNs não estão restritos a ambientes hospitalares, podendo causar infecções adquiridas na comunidade. As ITUs estão entre as principais doenças de origem comunitária, seguidas de pneumonia. Nos EUA, as ITUs são a causa de mais de 7 milhões de consultas médicas anualmente (Bonkat *et al.*, 2017). Os agentes etiológicos envolvidos nas ITUs, incluem em sua maioria, bactérias gram-negativas e gram-positivas. A espécie bacteriana *E. coli* é o principal agente responsável por essas infecções, seguido de *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter spp* (Floresmireles *et al.*, 2015). Além disso, a pneumonia adquirida na comunidade (PAC) é uma das principais causas proeminentes de mortalidade e morbidade com importante impacto clínico em todo o mundo. No Brasil, a PAC constitui a principal causa de internação via Sistema Único de Saúde (SUS). Estima-se que em 2017 ocorreram cerca de 598.668 internações por PAC, com taxa de 52.776 óbitos no país (Ministério da Saúde, 2017; Gomes, 2018). Portanto, os BGN possuem destaque direto em infecções de caráter oportunistas, sendo os principais patógenos relacionados com IRAS e infecções adquiridas na comunidade.

#### 1.4 Opções terapêuticas e mecanismos de resistência emergentes em BGN

Em condições normais, ou seja, ausentes de mecanismos de resistência, as infecções por BGN podem ser combatidas com antimicrobianos de diferentes classes, como os



betalactâmicos, as fluoroquinolonas e os aminoglicosídeos (Livermore, 2012; Fritzenwanker *et al.*, 2018). Os betalactâmicos representam uma vasta classe de antimicrobianos que, na ausência de resistência bacteriana, são medicamentos eficazes, bem tolerados e amplamente descritos no combate a infecções por BGNs (Babic, Hujer e Bonomo, 2006). Atuam como agentes bactericidas por meio da inibição da síntese da parede celular bacteriana, como resultado de sua ligação covalente às proteínas ligantes de penicilina (PBPs), enzimas envolvidas nas etapas finais de ligação cruzada durante a construção de peptidoglicanos, um dos principais componentes da parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas (Bush e Bradford, 2016). A reação de transpeptidação é interrompida devido à semelhança estrutural dos betalactâmicos com o terminal D-alanil-D-alanina do pentapeptídeo ligado ao ácido N-acetilmurâmico da célula em crescimento (Tipper e Strominger, 1965). Ao mesmo tempo, enzimas bacterianas realizam a autólise da parede celular, tornando a membrana plasmática permeável e levando ao seu rompimento (Babic, Hujer e Bonomo, 2006; Goffin e Ghuysen, 1998). O anel betalactâmico corresponde à região comum entre as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, que são diferenciadas entre si pela presença de radicais circulares ou lineares (Bush e Bradford, 2016).

O principal mecanismo de resistência desenvolvido pelos BGNs é a produção de enzimas betalactamases, capazes de degradar uma série de betalactâmicos (Bush, 2018). Existem vários grupos de betalactamases com espectros distintos, porém, aquelas classificadas como ESBL (do inglês, *Extended Spectrum Beta-Lactamases*) e as carbapenemases são as mais críticas por limitar a eficácia de muitas opções terapêuticas. As ESBLs são responsáveis por impedir a ação das penicilinas, cefalosporinas de primeira a quarta geração como também os monobactâmicos, mas não cefamicinas ou carbapenêmicos (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995). Dentre as diferentes enzimas classificadas nesse grupo, é preciso chamar atenção para a CTX-M que, nos últimos anos, tornou-se a ESBL mais prevalente em ambientes hospitalares e comunitários (Mazzariol, Bazaj e Cornaglia, 2017).

Os carbapenêmicos foram os únicos antimicrobianos restantes da classe dos betalactâmicos com potencial para combater infecções por BGNs produtores de ESBL (Nicolau, 2008). Sua estrutura também é formada por um anel betalactâmico, porém, ligada a uma cadeia penta-cíclica não saturada formando, assim, o anel carbapenêmico. Essa é a estrutura responsável por garantir resistência às demais betalactamases devido a essa pequena alteração estrutural (Papp-wallace *et al.*, 2011). No entanto, seu uso como recurso alternativo no tratamento por infecções causadas por essas bactérias produtoras de ESBL também levou à

seleção e emergência de BGN produtores de carbapenemase (Spera, Esposito e Pagliano, 2019). A produção destas últimas enzimas inviabiliza o tratamento de infecções por qualquer betalactâmico (Martínez-Martínez, 2018).

As fluoroquinolonas, no início dos anos 2000, tornaram-se a classe de antimicrobianos mais comumente prescrita nos EUA; possuem amplo espectro sobre as espécies bacterianas, e são divididas em 2°, 3° e 4° gerações. Cada geração representa alguma modificação no núcleo de quinolona de modo a aumentar a sua atividade sobre bactérias gram-negativas, bactérias gram-positivas e anaeróbias. No geral, as fluoroquinolonas são bactericidas, promovendo a inibição direta da síntese de DNA através de sua forte interação com duas enzimas essenciais para a replicação do DNA conhecidas como DNA girase e topoisomerase IV (Maris *et al.*, 2021).

Os mecanismos de resistência às fluoroquinolonas envolvem principalmente mutações em genes que codificam as enzimas alvos, como os genes *gyrA* envolvidos na produção da enzima DNA-girase e os genes *parC* envolvidos na codificação da topoisomerase IV (Redgrave *et al.*, 2014). A região do gene onde surgem as mutações são conhecidas como região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) que geram substituições de aminoácidos, levando a pequenas alterações estruturais na DNA-girase e topoisomerase IV e assim reduzem a afinidade de sua ligação às fluoroquinolonas (Hooper, 2000). Os mecanismos de resistência ainda podem envolver genes localizados em elementos móveis, como é o caso da família *qnr*, encontrado pela primeira vez em plasmídeo de uma amostra clínica de *K. pneumoniae* (Martínez-Martínez, Pascual e Jacoby, 1998). O gene *qnr* é responsável pela codificação da proteína Qnr capaz de se ligar à topoisomerase, o que impede fisicamente a ligação do antibiótico à enzima alvo (Xiong *et al.*, 2011). Outros genes carregados por plasmídeos também podem conferir resistência às fluoroquinolonas como *aac(6')-lb-cr* responsável por codificar uma acetiltransferase aminoglicosídeo capaz de acetilar e interferir com a atividade de algumas fluoroquinolonas, e os genes *oqxAB* e *qepA* que codificam sistemas de efluxo capazes de exportar moléculas do antimicrobiano para fora da célula (Redgrave *et al.*, 2014). Outros mecanismos como mudanças de permeabilidade, que levam à redução da absorção do antimicrobiano, e o aumento de bombas de efluxo podem influenciar positivamente a resistência às fluoroquinolonas (Correia *et al.*, 2017).

Os aminoglicosídeos são outra classe de antimicrobianos que também possui amplo espectro, sendo usados principalmente contra bactérias gram-negativas e menos frequentemente sobre gram-positivas (Ginkla, Wojnowski e Wasik, 2020). São classificadas

em dois grupos, os de origem natural como a neomicina, gentamicina e estreptomicina, e as semissintéticas, por exemplo amicacina, dibecacina, entre outras. Os aminoglicosídeos interferem na tradução através de sua ligação à subunidade A do rRNA 30S do ribossomo bacteriano, o que leva síntese de proteínas aberrantes na célula bacteriana (Krause *et al.*, 2016).

As bactérias podem resistir aos aminoglicosídeos através de mutações no sítio alvo da droga ou pela modificação enzimática de aminoácidos constituintes de proteínas ribossômicas, além da expressão de bombas de efluxo (Davies e Wright, 1997). O mecanismo de resistência mais comum entre as bactérias é a produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs), de origem intrínseca ou adquirida, e que são divididas em três grupos: acetiltransferase (AAC), fosfotransferase (APH) e adeniltransferase (AAD ou ANT). Essas enzimas promovem a desativação do fármaco através de modificações em grupos metil ( $\text{NH}_3$ ) ou hidroxilas (OH) em várias posições do aminoglicosídeo (Ramirez e Tolmasky, 2010). Os genes *armA*, *rmtB* e *rmtC* codificam enzimas 16S rRNA metiltransferases (MTases) que conferem amplo espectro de resistência aos aminoglicosídeos por meio da adição de grupos  $\text{CH}_3$  em resíduos específicos dentro da subunidade A do rRNA 16S (Wachino, *et al.*, 2020).

Os genes responsáveis por codificar ESBLs, carbapenemases e resistência às fluoroquinolonas e aminoglicosídeos frequentemente estão presentes em plasmídeos que são facilmente transferidos entre as bactérias (Brolund e Sandegren, 2016; Kopotsa, Sekyere e Mbelle, 2019; Vinué *et al.*, 2020; Wachino *et al.*, 2020). Além disso, esses plasmídeos muitas vezes carregam outros fatores de resistência concomitantemente, como é o caso de cepas resistentes aos aminoglicosídeos a partir da produção de MTase e que frequentemente podem carregar determinantes genéticos de resistência aos betalactâmicos e fluoroquinolonas (Bartoloni *et al.*, 2016; Lupo *et al.*, 2018; Gajamer *et al.*, 2019). Com isso, BGN pode adquirir esses plasmídeos, tornando-se cepas extensivamente resistentes aos antimicrobianos (Schwaber e Carmeli, 2008).

A emergência de Bacilos gram-negativos resistentes aos antimicrobianos (BGN-RA) aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e betalactâmicos, incluindo penicilinas, monobactâmicos, cefalosporinas e carbapenemas, associada à ausência de desenvolvimento de novos medicamentos, fez com que as polimixinas fossem revisitadas quanto à sua eficácia e segurança para combater as infecções causadas por esses organismos, tornando-se um

importante fármaco no tratamento dessas infecções (Loho e Dharmayant, 2015; Kasiakou *et al.*, 2020).

## 1.5 Polimixinas

As polimixinas fazem parte de uma classe de antibióticos polipeptídicos de caráter catiônico, separadas em cinco variantes de acordo com suas estruturas (polimixina A, B, C, D e E). Dessas, somente as polimixinas B e E (colistina) são comercializadas e utilizadas na medicina, enquanto as outras são extremamente tóxicas (Ahmed *et al.*, 2020). A colistina foi isolada pela primeira vez na década de 1940, como produto da bactéria *Paenibacillus polymyxa* isolada de solo, sendo amplamente utilizada no combate às infecções bacterianas naquela época (Koyama, 1950 *apud* Ahmed *et al.*, 2020). Devido ao seu alvo ser a membrana externa bacteriana, possui eficácia somente sobre espécies gram-negativas (Stefaniuk e Tyski, 2019).

Os BGNs contra os quais a colistina se mostra eficaz incluem *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp. e *Citrobacter* spp. (Kwa, Tam e Falagas, 2008). Por outro lado, a colistina é inativa contra alguns BGNs como *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp. e *Serratia* spp., devido à resistência intrínseca ao antimicrobiano pela produção de LPS carregado positivamente (Kwa, Tam e Falagas, 2008; Baron *et al.*, 2018).

Há relatos de eventos adversos associados à nefrotoxicidade e neurotoxicidade causados pelo uso da polimixina, motivo pelo qual sua administração clínica na década de 1970 foi suspensa (Ahmed *et al.*, 2020). Estudos mostram que a nefrotoxicidade pode estar diretamente ligada à dose do medicamento administrado, podendo ocorrer em até 60% dos pacientes tratados pela via intravenosa (Kubin *et al.*, 2012). Acredita-se que ao serem absorvidas e filtradas pelos rins, as polimixinas acumulam-se nos túbulos renais proximais, o que mais tarde desencadeia uma cascata de eventos danosos para o organismo, envolvendo ativação de vias apoptóticas celulares, estresse oxidativo, parada do ciclo celular das células do paciente, entre outras reações (Azad, Nation e Velkon, 2019). Ainda que em menor incidência, possivelmente podem promover o bloqueio neuromuscular de pacientes através da interrupção da liberação de acetilcolina e, assim, afetar a neurotransmissão de sinais responsáveis por induzir movimentos musculares, tendo efeito neurotóxico. Todavia, na

maioria das vezes são eventos raros e que se apresentam de forma leve (Falagas e Kasiakou, 2006).

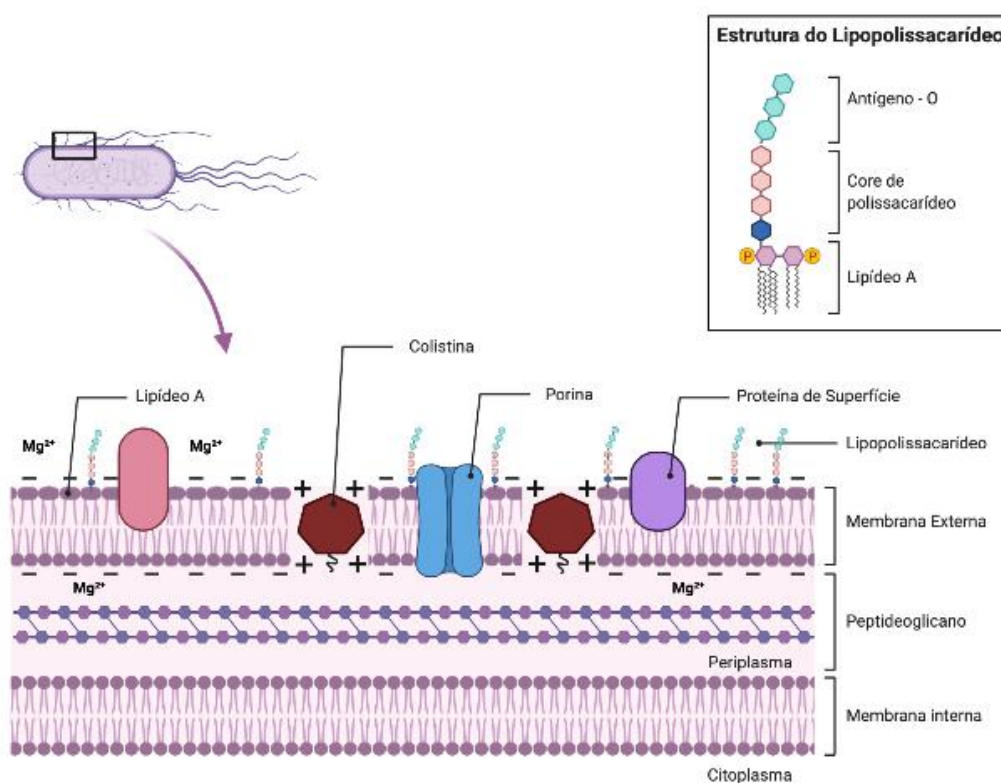
Há duas formulações de colistina disponíveis como opções de tratamento para infecções causadas por BGN, a primeira é conhecida como sulfato de colistina (SC), usado de forma oral ou tópico, e a segunda é o colistimetato de sódio (CMS), caracterizado por ser um pró fármaco inativo, usado por via parenteral e nebulização, relativamente mais fraco que o SC (Bialvaei e Kafil, 2015). No entanto, estudos mostram que o tratamento com CMS está associado ao maior risco de pacientes desenvolverem lesão renal aguda (LRA), distúrbio caracterizado pela diminuição da capacidade dos rins em filtrarem resíduos metabólitos do sangue (Pampa-Saico *et al.*, 2020).

As polimixinas são formadas estruturalmente por um anel de peptídeo policatiônico de caráter hidrofílico ligado a uma curta cauda de ácido graxo hidrofóbico (Kaye *et al.*, 2016). Pequenas alterações estruturais podem ser observadas em cada polimixina, representado por sua classificação em 5 grupos (A-E) (Timbre *et al.*, 2016) (Wanty *et al.*, 2013). A membrana externa bacteriana possui dois folhetos: o fosfolipídico interno e o externo, que contém ancorado algumas estruturas, dentre elas, o LPS, algumas proteínas e fosfolipídeos (Delcour, 2008). O LPS, também chamado de endotoxina, possui três diferentes domínios: cadeia variável do lipídio O, uma região *core* de polissacarídeos, e por fim, o lipídio A. No folheto externo da membrana se encontra ancorado o lipídio A, de modo que o mesmo se volta para a face celular externa (Nikaido, 2003). Estruturalmente, o lipídeo A é formado por hidrocarbonetos saturados que se associam fortemente ao folheto externo bacteriano por meio de forças de Van der Waals, além da presença de cátions divalentes, como  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , que auxiliam na ligação e associação das moléculas de LPS adjacentes (Raetz e Whitfield, 2001). A principal função da membrana externa é ser uma barreira de permeabilidade para evitar a entrada de compostos nocivos e, ao mesmo tempo, ser capaz de permitir a entrada de nutrientes fundamentais para o desenvolvimento da bactéria (Nikaido, 2003). Além disso, as porções de fosfodiéster presentes no lipídio A possuem carga aniônica altamente repulsiva, o que reforça a estabilidade e barreira formada pela membrana externa (Velkov *et al.*, 2013).

O modo exato de ação das polimixinas sobre as bactérias gram-negativas ainda é muito controverso, porém, segundo a literatura, existem cinco formas que esses antimicrobianos conseguem exercer sua atividade bactericida sobre o microrganismo, são elas: (i) atividade direta ou absorção autopromovida (Hancock, 1997); (ii) via de contato vesícula-vesícula (Clausell *et al.*, 2006); (iii) via de morte do radical hidroxil (Kohanski *et al.*,

2007); (iv) inibição de enzimas respiratórias (Deris *et al.*, 2014); e (v) atividade anti-endotóxica (Falagas, Kasiakou e Saravolatz, 2005).

O mecanismo de ação mais aceito como principal é o de absorção autopromovida. Nele temos a ligação da colistina à membrana externa bacteriana através de interações eletrostáticas entre os resíduos catiônicos da colistina com os resíduos aniônicos do lipídio A do LPS (Velkov *et al.*, 2010). Desta forma, há o deslocamento competitivo das cargas positivas da colistina com os cátions divalentes  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  localizados nos grupos fosfatos carregados negativamente dos lipídeos da membrana, representado na **Figura 1** (Kaye *et al.*, 2016). Todo esse processo leva à desestabilização das moléculas de LPS, rompendo a capacidade de barreira de permeabilidade seletiva garantida pela membrana externa através de fissuras nela causadas, ocasionando em desequilíbrios osmóticos, e assim, moléculas de colistina são absorvidas para o interior da célula, promovendo a lise da membrana interna; o que permite o extravasamento de elementos citoplasmáticos e leva a célula à morte (Velkov *et al.*, 2013).



**Figura 1 - Mecanismo de ação da colistina em bactérias gram-negativas.** A colistina se associa à membrana externa por meio de interações eletrostáticas entre seus resíduos catiônicos com as porções aniônicas do lipídeo A. Em seguida, a colistina se insere na membrana externa, desencadeando a desestabilização

da barreira de permeabilidade seletiva promovida pela membrana celular bacteriana. Imagem produzida com o programa BioRender.

A polimixina, após transitar pela membrana externa bacteriana, também pode interagir com vesículas fosfolipídicas aniônicas, ocasionando a fusão do folheto externo da membrana externa com o folheto interno da membrana citoplasmática, o que gera um desequilíbrio osmótico celular e, conseqüentemente, a morte da célula bacteriana pela via de contato vesícula-vesícula (Cajal *et al.*, 1996). A fusão da membrana externa com a membrana interna eventualmente pode gerar a formação de radicais, como  $O_2^-$ , que reage com a enzima superóxido dismutase formando  $H_2O_2$  (Imlay, 2013). A presença de peróxido de hidrogênio no ambiente celular leva à oxidação de moléculas de ferro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) presente na célula em ferro férrico ( $Fe^{3+}$ ) liberando moléculas de  $OH^-$ . Toda essa liberação incontrolável de  $OH^-$  na célula é conhecida como via de morte do radical hidroxil, capaz de induzir danos oxidativos no DNA, proteínas e lipídeos bacterianos, levando à morte celular (Kohanski *et al.*, 2007).

Além disso, ao se ligar ao LPS bacteriano, a colistina leva à sua neutralização o que, conseqüentemente, inibe a liberação da endotoxina antígeno A, esse processo é chamado de atividade anti-endotoxina, uma das possíveis propriedades geradas pela ação da colistina (Gough, Hancock e Kelly, 1996). É um processo importante visto que, ao inibir a ação da endotoxina no organismo, evita a ativação de citocinas que, eventualmente, levariam ao choque do paciente e a respostas inflamatórias exageradas, causando danos celulares (Ahmed *et al.*, 2020). A colistina ainda é capaz de inibir enzimas respiratórias importantes para o desenvolvimento da cadeia respiratória bacteriana como a NADH-quinona oxidorreduases tipo II, atuando como portadores que transportam elétrons e prótons em complexos proteicos constituintes da cadeia respiratória vital para a sobrevivência do microrganismo (Deris *et al.*, 2014).

## 1.6 O uso e a resistência à colistina

A retomada do uso de colistina como uma das últimas opções de tratamento contra bactérias extensivamente resistentes mostrou eficácia no combate às infecções. Atualmente, as polimixinas podem ser administradas isoladamente ou em combinação a outras classes de antimicrobianos para essa finalidade. Existem algumas razões pelas quais a terapia combinada pode ser favorável. A primeira delas é que em alguns casos de resistência, a concentração

plasmática de colistina administrada ao paciente permanece baixa, mesmo sendo administrada em doses diárias superior ao limite indicado no rótulo do medicamento, dificultando sua ação sobre a bactéria (Garonzik et al, 2011; Nation et al, 2016). Nesses casos, não se torna possível aumentar as doses de colistina devido ao seu alto potencial nefrotóxico (Zavascki e Nação, 2017). Além disso, há o surgimento de resistência à colistina transferível rapidamente logo após a sua monoterapia (Rojas *et al.*, 2017). Outra justificativa para a combinação de diferentes fármacos durante a terapia com as polimixinas é a sua combinação com outros medicamentos que exibem o mesmo efeito de permeabilizar a membrana plasmática da bactéria, o que permitiria concentrações aumentadas de agentes antibacterianos combinados que possuem alvos intracelulares (Lenhard *et al.*, 2017).

Algumas espécies como *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase vem se tornando patógenos nosocomiais cada vez mais proeminentes, tornando-se um desafio terapêutico (Tacconelli *et al.*, 2014). Um estudo realizado em 2014, analisou a farmacodinâmica da colistina em combinação com fosfomicina no combate à *K. pneumoniae* produtora de KPC. Quando administradas separadamente, surgiam subpopulações resistentes às drogas. No entanto, a combinação colistina/fosfomicina apresentou atividade bactericida sustentada em amostras sensíveis aos dois antimicrobianos (Zhao *et al.*, 2017). Isso pode ser devido ao fato da colistina ter aumentado a permeabilidade da membrana externa bacteriana, o que teria facilitado a melhor penetração da fosfomicina no local de ação (Vaara, 2010). Outro estudo publicado em 2016, verificou a otimização da polimixina B em combinação com doripenem para combater cepas mutantes de *P. aeruginosa*. Foi visto que a combinação de fármacos teve um efeito positivo, apresentando atividade de morte aumentada contra todas as cepas analisadas (Ly *et al.*, 2016). Ainda assim, é preciso mais estudos que visem acompanhar as diferentes combinações e efeitos que a terapia combinada pode causar (Tsuji *et al.*, 2019).

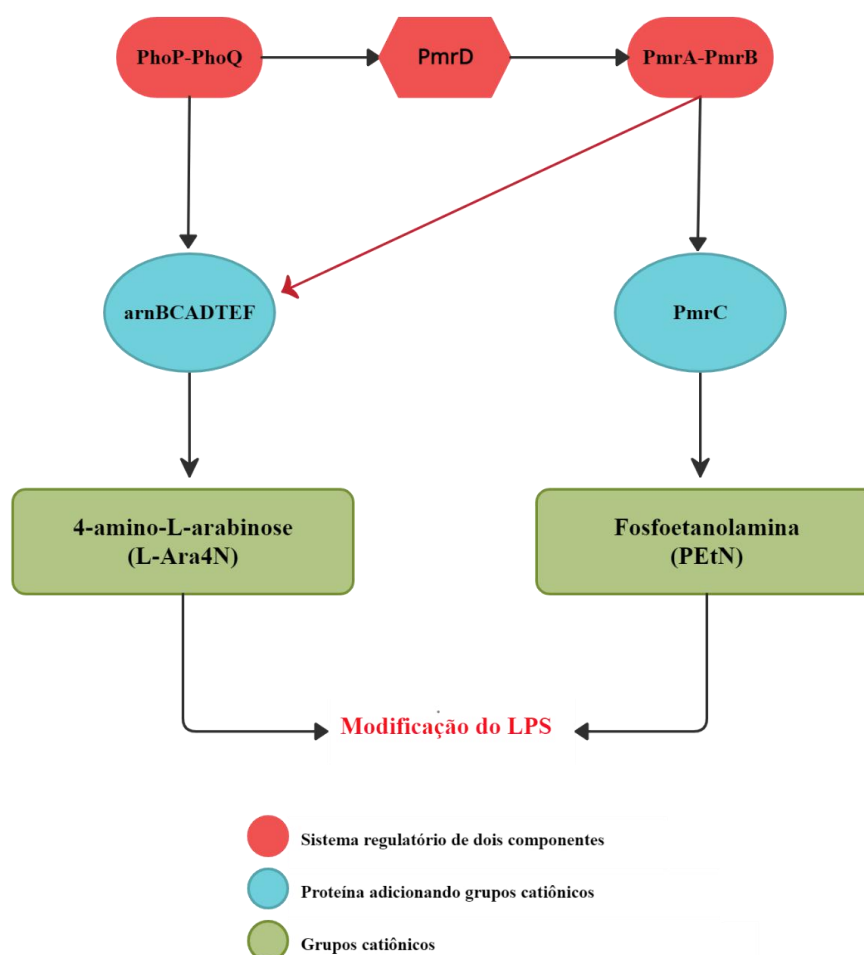
Apesar de sua eficácia no tratamento de infecções, espécies bacterianas antes amplamente sensíveis à colistina, passaram a apresentar cepas resistentes em um curto período de tempo (Park *et al.*, 2011). Devido ao alvo da polimixina ser o LPS, a maioria dos mecanismos de resistência envolvem alterações na carga e estrutura dessa molécula (Bialvaei e Kafil, 2015). A resistência bacteriana à colistina pode ocorrer de maneira intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca às polimixinas é expressa por algumas bactérias gram-negativas como *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp. e *Serratia* spp. (Biswas *et al.*, 2014). A maioria dessas espécies apresentam baixa susceptibilidade à polimixina através da adição de grupos catiônicos como 4-amino-L-arabinose (L-Ara4N) ao LPS, ou pela adição



de moléculas de fosfoetanolamina (PEtN) através da enzima fosfoetanolamina transferase (Olaitan, Morand e Rolain, 2014). Ambos os mecanismos são responsáveis por garantir a redução da carga negativa do LPS, ocasionando na baixa interação eletrostática da polimixina com a membrana externa bacteriana (Timble *et al.*, 2016).

A resistência adquirida pode acontecer mediante modulação da expressão de genes cromossômicos ou pela aquisição de DNA pela transferência horizontal. O mecanismo envolvido no primeiro caso, também conhecido como resistência adaptativa, é variável de acordo com a espécie bacteriana, porém, a maioria será mediada principalmente pela ativação de genes constitutivos do sistema de dois componentes PmrAB e PhoPQ (Falagas, Rafailidis e Matthaiou, 2010), como representado na **Figura 2**. A ativação desses sistemas envolve principalmente a presença de peptídeos catiônicos como a polimixina ou como respostas a estímulos ambientais, como variadas concentrações de magnésio, cálcio, altas concentrações de ferro e ao pH baixo do meio (Timble *et al.*, 2016). Os sistemas de dois componentes estão envolvidos na regulação gênica bacteriana estimulando ou reprimindo determinados genes (Girardello e Gales, 2012).

Quando ativado, o sistema PhoP-PhoQ regula positivamente o operon *arnBCADTEF*. Esse operon é responsável por codificar a via de construção do LPS, reduzindo a sua carga negativa e limitando a ligação da polimixina (Gooderham e Hancock, 2009). O sistema PmrA-PmrB, quando ativado, promove a regulação positiva dos operons *pmrC* e *arnBCADTEF*, que desencadeiam na expressão do gene *pmrE*, pela adição de L-Ara4N ao lipídeo A (Olaitan, Morand e Rolain, 2014). Além disso, o sistema PhoP-PhoQ, pode induzir indiretamente o sistema PmrA-PmrB através da ativação do gene *pmrD* (Fox, Wosten e Groisman, 2000). Os mecanismos de resistência através dos componentes PmrA-PmrB são comuns entre as espécies *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp., *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Enquanto que a resistência mediada pelos componentes PhoP-PhoQ, são associadas a espécies como *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp. (Olaitan, Morand e Rolain, 2014). Além disso, já foi relatado mecanismos de resistência adaptativos adicionais em cepas de *K. pneumoniae*, como o aumento da produção de cápsula polissacarídica e a produção de vesículas, que também levam à diminuição da interação do antimicrobiano com a superfície celular bacteriana (Campos *et al.*, 2004).



**Figura 2 - Caminhos de regulação de modificações adaptativas de LPS.** Adaptado de Olaitan, Morand e Rolain, 2014, mediante autorização.

Até 2015 apenas a resistência adaptativa às polimixinas era observada em amostras clínicas. No entanto, em 2016, foi descrito o gene *mcr-1* presente em uma cepa de *E. coli* de origem suína e localizada em plasmídeo, portanto, transferível horizontalmente (Liu *et al.*, 2016). O gene *mcr-1* é responsável por codificar a produção de moléculas PEtN através da enzima fosfoetanolamina transferase, capaz de catalisar a adição de moléculas PEtN aos grupos fosfatos localizados no lipídeo A, reduzindo sua carga negativa e sua afinidade pela polimixina (Baron *et al.*, 2016). Desde então, outras variantes de *mcr* foram descritas e todas produzem a enzima fosfoetanolamina transferase, tendo como diferença pequenas alterações em sua sequência proteica (Stefaniuk e Tyski, 2019).

Em 2016, na Bélgica, o gene *mcr-2* foi identificado pela primeira vez em uma estirpe de *E. coli* isolada de amostras de fezes diarreicas de bovinos e leitões. A nova amostra do gene possuía cerca de 76,75% de identidade de seus nucleotídeos com *mcr-1* (Xavier *et al.*, 2016). Cerca de um ano depois, em 2017, a variante *mcr-3* foi descrita em amostra de *E. coli*

de origem suína. A nova variante apresentou 45% e 47% de identidade de sua sequência nucleotídica com *mcr-1* e *mcr-2*, respectivamente (Yin *et al.*, 2017).

Em 2017, um novo estudo identificou a variante *mcr-4* em uma cepa de *Salmonella enterica* isolada de um porco durante seu abate em 2013 na Itália. A mesma variante ainda foi localizada anos depois, em 2015 e 2016 na Espanha e Bélgica, respectivamente, em cepas de *E. coli* coletadas durante o diagnóstico de rotina de diarreia em suínos. A nova variante apresentou cerca de 34%, 35% e 49% de identidade com os nucleotídeos dos genes *mcr-1*, *mcr-2* e *mcr-3*, respectivamente (Carattoli *et al.*, 2017).

Um estudo realizado mais tarde, em 2017 na Alemanha, detectou a variante *mcr-5*, presente em uma cepa de *S. enterica* isolada de aves e alimentos. A nova variante foi considerada distinta de *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* e *mcr-4*, apresentando cerca de 36,11%, 35,19%, 34,72% e 33,71% de similaridade dos aminoácidos da sequência proteica, respectivamente (Borowiak *et al.*, 2017). Ainda em 2017, a variante *mcr-6* foi detectada na Grã-Bretanha em *Moraxella* spp. isoladas de suínos, entre os anos de 2014 a 2015. A nova variante abrigava cerca de 87,9% de identidade com o gene *mcr-2*, isolado de *E. coli* (AbuOun *et al.*, 2017).

A variante *mcr-7* foi identificada em 2018 na China, em *K. pneumoniae* isolada de galinhas. O novo gene apresentou 70% de identidade com os aminoácidos do gene *mcr-3*. Além disso, a nova variante foi detectada em um plasmídeo transferível que também albergava o gene *bla<sub>CTX-M-55</sub>*, que codifica uma betalactamase do tipo ESBL (Yang *et al.*, 2018). Ainda no mesmo ano, a variante *mcr-8* foi detectada em plasmídeo transferível recuperado de outra cepa de *K. pneumoniae* isolada de amostras suínas. Sua sequência de aminoácidos apresentou 31,08%, 30,26%, 39,96%, 37,85%, 33,51%, 30,43% e 37,46% de similaridade com as variantes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6* e *mcr-7*, respectivamente (Wang *et al.*, 2018). Em 2019, a nova variante *mcr-9* foi detectada em um sorotipo de *S. enterica*, isolada pela primeira vez diretamente de um humano, um paciente no estado de Washington nos EUA em 2010. Essa variante demonstrou um perfil de sequência de aminoácidos com similaridade em torno de 64,5% do *mcr-3* (Carroll *et al.*, 2019).

A variante *mcr-10* foi a mais recentemente descrita, e segunda variante de origem humana, recuperada de uma amostra de ascite de um paciente tratado em um hospital da China em 2016 (Wang *et al.*, 2020). A cepa recuperada pertencia à espécie *Enterobacter roggkampii* e, além do gene *mcr-10*, essa amostra carregava genes de resistência a outras classes de antimicrobianos, como o que codifica a betalactamase do tipo AmpC, *bla<sub>MIR-5</sub>* que garante resistência a penicilinas, cefalosporinas de primeira a terceira geração e a aztreonam

e, ainda, apresentava resistência à fosfomicina (Wang *et al.*, 2020). Devido à baixa detecção dessas variantes em humanos, é possível inferir a possibilidade de que variantes *mcr* tenham sua origem na esfera animal.

### 1.7 Distribuição e transmissão de genes *mcr* e BGN multirresistente pelo ambiente

Estudos de vigilância retrospectiva de amostras armazenadas portadoras de *mcr* indicam que o primeiro *mcr* pode ter surgido em 1980 na China em amostras de frango, na mesma época em que a colistina começou a ser usada para fins agrícolas em meio aos aditivos alimentares (Shen *et al.*, 2016). Desde a primeira evidência de *mcr* em espécies bacterianas, o gene já foi detectado em 47 países diferentes em cinco continentes, dentre eles: Ásia (China, Japão, Laos, Vietnã, Malásia, Cingapura, Camboja, Bahrein, Taiwan, Hong Kong, Tailândia, Coreia do Sul, Rússia, Paquistão, Emirados Árabes Unidos, Arábia Saudita Arábia e Omã), Europa (Áustria, Estônia, Reino Unido, Holanda, Noruega, Espanha, Alemanha, França, Bélgica, Dinamarca, Itália, Polônia, Portugal, Rússia, Suíça, Suécia, Lituânia e Hungria), África (Argélia, Egito, Tunísia, Marrocos e África do Sul), Américas (EUA, Canadá, Colômbia, Argentina, Brasil e Equador), e Oceania (Nova Caledônia e Austrália). Entre os países citados, o gene *mcr* foi identificado em fontes humanas, mas principalmente em gado, carne, produtos alimentícios, entre outras fontes, incluindo animais de companhia, selvagens e no meio ambiente (Nang, Li e Velkov, 2019).

Atualmente, todas as variantes de *mcr* foram detectadas na China, exceto a variante *mcr-6*. Isso pode ser devido ao maior número de pesquisas no país, bem como ao extenso uso das polimixinas como aditivo animal na agricultura chinesa, prática proibida no país somente em 2016 (Ling *et al.*, 2020; Walsh e Wu, 2016). O gene *mcr* já foi identificado em animais como gaivotas e pinguins migratórios, preocupante descoberta visto que esses animais são capazes de migrar de modo intercontinental, promovendo a disseminação da resistência (Sellera *et al.*, 2017; Ruzauskas e Vaskeviciute, 2016). Estudos mostram que os genes *mcr-1* e *mcr-9* são as variantes mais amplamente distribuídas no mundo, sendo identificados em amostras isoladas de 61 e 40 países em cinco continentes, respectivamente (Ling *et al.*, 2020). A maioria das amostras positivas para o gene *mcr-9* foram encontradas nos EUA. Dentre estas, 71,1% carregavam também genes de resistência aos aminoglicosídeos e 58,65% apresentaram genes codificadores de carbapenemases, indicando que a possível disseminação

de *mcr-9* possa estar relacionada ao uso de outras classes de antimicrobianos (Ling *et al.*, 2020).

A espécie bacteriana gram-negativa mais frequente entre as amostras isoladas positivas para o gene *mcr* é a *E. coli*, correspondendo aproximadamente a 91%, enquanto que outras gram-negativas como *S. enterica* a 7% e *K. pneumoniae* a 2% (Nang, li e Velkov, 2019). É importante chamar atenção para esses dados, visto que o gene *mcr* vem constantemente sendo associado aos BGNs, principalmente enterobactérias produtoras de betalactamases portadoras de genes *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>TEM</sub>, além de carbapenemases como *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>NDM</sub> (Nang, li e Velkov, 2019).

A descoberta de genes codificadores de carbapenemase co-localizados com *mcr* em um mesmo plasmídeo é preocupante, visto que um único evento de aquisição gênica pode transformar uma estirpe suscetível em resistente a múltiplas classes de antimicrobianos, o que limita ou mesmo inviabiliza o tratamento de infecções (Ling *et al.*, 2020).

Não obstante, é importante lembrar que a microbiota intestinal humana pode ter grande participação na transferência de genes de resistência a antimicrobianos (GRA) para o ambiente. O microbioma intestinal é constituído por uma comunidade bacteriana altamente diversificada, que além de desempenhar papéis importantes na proteção de várias doenças, pode desempenhar função importante na resistência aos antimicrobianos, graças ao resistoma humano, que diz respeito a coleção de genes de resistência no microbioma humano (Singh *et al.*, 2019). Desta forma, compreendê-lo é de grande importância, principalmente em populações hospitalizadas e não hospitalizadas, visto que a microbiota comensal pode hospedar GRAs e transferi-los para bactérias patogênicas durante uma infecção (Liu *et al.*, 2012). Um estudo realizado em 2021, avaliou a distribuição e prevalência de genes de resistência à colistina mobilizados na microbiota intestinal humana (Andrade *et al.*, 2021). Nele, foi identificado um total de 2.079 genes de resistência a antibióticos classificados como *mcr* em 2.046 genomas montados em metagenoma distribuídos em 1.596 indivíduos de 41 países. Os autores ainda destacaram a presença de outros GRAs co-ocorrendo com genes *mcr* que afetam a atividade de agentes das classes beta-lactâmicos e glicopeptídeos (Andrade *et al.*, 2021).

Apesar dos BGN-RA serem mais descritos nos ambientes hospitalares, os genes *mcr* não estão restritos a esses locais. O gado vem sendo considerado um dos principais reservatórios para bactérias carreadoras do gene *mcr*, entretanto, os suínos possuem grande destaque (Kempf, Jouy e Chauvin, 2016). No entanto, os bovinos e suínos não são as únicas

espécies de animais capazes de carregarem resistência às polimixinas. O gene *mcr-1* já foi identificado em *E. coli* isolada de animais de companhia, como cães (Lei *et al.*, 2021) e gatos (Rumi *et al.*, 2019). Isso ressalta a alta possibilidade da mesma cepa ser transferida entre esses animais e os seres humanos (Zhang *et al.*, 2016). Nem mesmo o ambiente está ausente da colonização por bactérias resistentes à polimixina, isso porque o gene *mcr* já foi detectado em diferentes fontes de água, como em águas residuais de rios não tratados (Marathe *et al.*, 2017), estações de tratamento de águas residuais (Hembach *et al.*, 2017), água do mar (Fernandes *et al.*, 2017; Cordeiro-Moura *et al.*, 2022), rios (Zurfuh *et al.*, 2016), canais e poços (Sun *et al.*, 2017). Isso reforça a potencial disseminação da resistência à polimixina entre animais residentes desses locais e humanos.

O primeiro relato de resistência à polimixina em *Enterobacteriaceae* no Brasil foi em 2006 (Gales *et al.*, 2006). Naquela época, o uso de colistina e polimixina B eram baixos, demonstrando em média uma taxa de resistência de 0,5% em *E. coli*, 1,8% em *K. pneumoniae* e 16,7% em *Enterobacter* spp. Alguns anos depois, em 2012, houve o aumento de 15% da taxa de resistência a polimixinas em cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC de diversos estados brasileiros (Pereira *et al.*, 2012). No ano de 2014, um estudo avaliou o surgimento de resistência à colistina no maior complexo hospitalar universitário de São Paulo durante os anos de 2010 a 2014. Os organismos mais frequentemente isolados pertenciam à família *Enterobacteriaceae* (86,1%), seguido de *Acinetobacter* spp (7,6%) e *Pseudomonas* spp (6,3%) (Rossi *et al.*, 2017). Um ano depois, um relatório realizado novamente na cidade de São Paulo evidenciou um aumento na taxa de resistência a polimixina B entre cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC, de 0% em 2011 para 27,1% em 2015 (Bartolleti *et al.*, 2016; Sampaio e Gales, 2016).

Além disso, é importante enfatizar que o Brasil é um grande produtor e exportador de alimentos, sendo necessário analisar o panorama de resistência bacteriana associada aos animais de criação (Rabello *et al.*, 2020). A variante *mcr-1* foi detectada pela primeira vez no Brasil por meio de triagem de cepas de *E. coli* isoladas de amostras fecais de porcos e galinhas. As amostras foram coletadas de diferentes estados brasileiros, como Santa Catarina, Minas Gerais, Paraná e São Paulo, durante os anos de 2012 a 2013 (Fernandes *et al.*, 2016). Simultaneamente, o gene *mcr-1* foi identificado em *swabs* retais de frango nunca expostos à polimixina, coletados em 2015 na região Sul do Brasil (Lentz *et al.*, 2016). A presença de *mcr-1* em aves sem exposição prévia à polimixina pode indicar a presença do gene em contexto ambiental previamente não detectado, como, por exemplo, a presença de *mcr-1* em solos de

produção de hortaliças no Estado do Rio de Janeiro onde a cama de frango era comumente utilizada como fertilizante orgânico (Fernandes *et al*, 2016; Oliveira *et al*, 2019). Ainda no Brasil, *mcr-1* já foi detectado em *E. coli* obtidas de amostras de carne de frango adquiridas em mercados varejistas do estado de São Paulo. Dentre as 409 carcaças de frango, a maioria também portava genes de betalactamases (Cyoia *et al*, 2019). Além disso, o gene foi detectado em *S. typhimurium* e *Salmonella schwarkergund* coletados em carne suína e de aves adquiridas nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo, respectivamente (Rau *et al*, 2018; Moreno *et al*, 2019).

A presença de patógenos resistentes aos antimicrobianos comensais no meio ambiente, corrobora para um potencial reservatório de bactérias multirresistentes. Um estudo realizado no Brasil em 2021, identificou os genes *mcr-9* e *bla<sub>KPC</sub>* em águas de recreação e areias de praias urbanas no Brasil (Furlan *et al.*, 2021). No mesmo ano, outro estudo identificou a presença de uma cepa de *E. coli* resistente a colistina carregando *mcr-1* coabitando com genes *bla<sub>CTX-M-2</sub>* e *bla<sub>CMY-2</sub>* isolada de um córrego urbano no Estado de São Paulo (Furlan *et al.*, 2021). Em 2022, mais um estudo realizado no Brasil, detectou a ocorrência de uma *E. coli* (JP24) resistente à colistina através de *mcr-1* isolada de águas costeiras recreativas na região Nordeste do país. Além da presença de *mcr-1*, a cepa ainda apresentava genes envolvidos com a resistência a beta-lactâmicos, tetraciclinas, trimetoprim, sulfonamidas, aminoglicosídeos, cloranfenicol, macrolídeo, lincosamida e estreptograma B (Cordeiro-Moura *et al*, 2022).

A presença de BGN-RA carreadores de *mcr* em animais silvestres também foi identificada em alguns estados brasileiros. No ano de 2016, um estudo revelou a presença de cepas *E. coli* carregando *mcr-1* e produtoras de ESBL em pinguins de Magalhães migratórios, na costa sudeste do Brasil. Um grave achado, visto que a presença de genes de resistência em animais silvestres migratórios, reforça o seu alto potencial de ser transferido entre diferentes espécies bacterianas, utilizando os animais como transporte (Sellera *et al.*, 2016). Um pouco mais tarde, em 2021, foi publicado um estudo acerca da presença de *mcr* e suas variantes em 107 isolados de *E. coli* de aves de produção coletadas entre abril de 2015 e junho de 2016 no Rio de Janeiro. A variante *mcr-1* foi a mais prevalente em 62 (57,9%) isolados, e o gene *mcr-5* identificado em 3 (2,8%) isolados (Barbieri *et al.*, 2021). Ainda no Brasil, em 2021, um grupo de pesquisadores identificaram uma cepa de *Enterobacter kobei* carreadora de *mcr-9.1* e produtora de CTX-M-15, infectando um golfinho-francisca de vida livre, ameaçado de extinção. O espécime isolado ainda apresentou resistência a uma série de outros

antimicrobianos, como aos aminoglicosídeos, trimetoprima, tetraciclina, quinolona, fosfomicina, sulfonamida e fenicol (Fuentes-Castilho *et al.*, 2021).

A resistência bacteriana é, portanto, um problema ecológico caracterizado por complexas interações entre humanos, animais e meio ambiente. Nesse contexto, é importante entender o conceito de *One Health*, que se baseia na dependência mútua de humanos e animais e no reconhecimento de que eles compartilham não apenas o mesmo ambiente, mas também muitas doenças infecciosas (Zinsstag *et al.*, 2012). Os fundamentos de *One Health* abrangem a saúde do meio ambiente, bem como humana e animal, promovendo a visão de que o recorrente crescimento da população humana é acompanhado por mudanças climáticas, poluição crescente e esgotamento de recursos da Terra. Todos esses fatores fizeram com que houvesse um aumento da ocorrência de doenças emergentes e reemergentes, incluindo doenças causadas por espécies bacterianas resistentes a antimicrobianos (Collignon e McEwen, 2019).

Desta forma, a saúde pública está ligada a um equilíbrio entre a saúde humana, animal e ambiental, isto é, se esses três grandes pilares estiverem em equilíbrio haverá a garantia de uma boa saúde, refletindo positivamente na expectativa de vida dos indivíduos. No entanto, durante anos a maioria das classes de antimicrobianos são usadas tanto em humanos quanto em animais, incluindo mamíferos domésticos, pássaros, animais de criação, entre outros, o que contribui diretamente para a disseminação de resistência bacteriana (McEwen e Cray, 2002). Sabe-se, portanto, que essas bactérias e os determinantes de resistência estão presentes no meio ambiente e podem servir como reservatório e veículo para esses organismos alcançarem os ambientes hospitalares. No entanto, essa via de retroalimentação do ambiente hospitalar com estirpes resistentes aos antimicrobianos ainda é sub explorada na literatura científica.

## 1.8 Colonização comunitária e disseminação de BGN multirresistentes

O TGI é colonizado por trilhões de microrganismos, dentre eles bactérias, vírus, fungos, arqueias e protozoários; que formam a microbiota anfibiônica. Fatores genéticos, respostas imunológicas e fatores dietéticos modulam a composição da microbiota para cada indivíduo (Wu *et al.*, 2020). Esse consórcio microbiano desempenha um papel muito importante para a saúde do hospedeiro, dentre eles, contribuir com o metabolismo de nutrientes complexos obtidos com a ingestão alimentar, com o metabolismo de xenobióticos e



de fármacos; mantém a estrutura e função da barreira intestinal e do TGI, impedindo a translocação de patógenos intestinais (Jandhyala *et al.*, 2015).

Alguns fatores como doenças e uso de medicamentos podem alterar a composição da microbiota. O tratamento com antimicrobianos, entre outras condições específicas, podem induzir ao rompimento da barreira física protetora gerada por esses organismos, facilitando a sua colonização por outros oportunistas, os quais podem causar danos ao hospedeiro (Peterson *et al.*, 2015). Desta forma, alterações nessa complexa relação entre microbiota e hospedeiro podem significar o aumento da susceptibilidade do indivíduo em desenvolver infecções e a ocorrência facilitada da aquisição de espécies resistentes, dentre eles, os BGN-RA (Weiss e Hennet, 2017).

Apesar dos BGN-RA serem comumente associados à etiologia de IRAS, esses microrganismos não estão restritos aos ambientes hospitalares, sendo frequentemente associadas às infecções adquiridas na comunidade (IAC) e descritos no meio ambiente (Nnadozie e Odume, 2019; Yang *et al.*, 2018). A nossa hipótese é de que o ambiente amplamente colonizado pode estar associado à colonização comunitária humana por esses organismos resistentes aos antimicrobianos, que pode servir como um reservatório para a disseminação de resistência bacteriana na comunidade e rota para sua (re)inserção nos hospitais.

Um estudo realizado na Alemanha entre os anos de 2014 e 2015 avaliou a colonização intestinal por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL e carbapenemases em viajantes internacionais que retornavam à Alemanha (Lubbert *et al.*, 2014). Durante análises de pré-viagem dos 205 participantes estudados foi observado que cerca de 6,8% (14) dos participantes já eram colonizados por bactérias produtoras de ESBL. Após a viagem, 58 (30,4%) participantes foram colonizados por *E. coli* produtora de ESBL, e 5 (8,6%) carregavam também, *K. pneumoniae* produtora de ESBL. Em uma revisão sistemática realizada em 2016 sobre a colonização fecal com enterobactérias produtoras de betalactamase de espectro estendido entre indivíduos saudáveis foi observada prevalência de 14% de colonização por espécies produtoras de ESBL, sendo que esse índice foi maior em países da Ásia (46%) e África (15%), e menor em países da região central (3%), norte (4%), sul da Europa (6%) e das Américas (2%). A enzima CTX-M foi a ESBL mais prevalente (Karanica *et al.*, 2016).

A colonização comunitária por BGN produtores de *mcr* também vem se tornando cada vez mais comum. Em 2017, foi publicado um estudo que buscou analisar a prevalência do

gene *mcr-1* em amostras de *E. coli* produtoras de betalactamase recuperadas de amostras fecais humanas coletadas em 2012 em aldeias rurais na China. Foi observado um total de 706 cepas de *E. coli* produtoras de ESBL isoladas de 411 pessoas em uma coleção de amostras fecais de 1000 residentes rurais saudáveis. O gene *mcr-1* foi encontrado em 3,5% dos isolados, mostrando a potencial disseminação comensal de *E. coli* produtora de *mcr-1* já em 2012 (Bi et al, 2017). Outro estudo realizado em 2020, mostra a alta prevalência de *E. coli* carregando *mcr-1* cromossomicamente através de transposons em residentes saudáveis no Vietnã. Um total de 57 isolados resistentes à colistina foram obtidos de 98 residentes. Cerca de 36,8% dos isolados carregavam *mcr-1* cromossômicos (Yamaguchi, 2020). Em 2021, foi observada a colonização de viajantes tchecos que vivem na República Tcheca por Enterobacteriaceae resistentes à colistina. Um total de 177 amostras de fezes foram investigadas, obtendo-se 15 isolados resistentes à colistina. Dois desses isolados carregavam *mcr-1*, ambas espécies identificadas como *E. coli*, novamente reforçando a presença das variantes de *mcr* no ambiente e o seu potencial de disseminação entre indivíduos saudáveis (Krutova et al, 2021).

Apesar da prevalência de *mcr* e suas variantes no ambiente, no Brasil, poucos são os estudos que investigaram os aspectos sobre a colonização comunitária por BGN-RA. No entanto, um recente estudo, publicado em 2021, avaliou a aquisição de determinantes de resistência antimicrobiana em *Enterobacterales* por viajantes internacionais recrutados entre os anos de 2015 e 2019 no Brasil. De 210 viajantes analisados, 12% estavam colonizados por *Enterobacterales* multirresistentes e 9% por *Enterobacterales* produtoras de ESBL antes da viagem. A aquisição de *Enterobacterales* multirresistentes ocorreu em 32% dos viajantes estudados. Além disso, um dos viajantes adquiriu uma amostra carregando gene *bla<sub>OXA-181</sub>*, e dois viajantes que visitaram o Peru retornaram colonizados por uma amostra cada carregando o gene *mcr-1* (Tufic-Garutti et al., 2021). Nesse contexto, torna-se necessário o aumento e aprofundamento de estudos que possibilitem a produção de mais conhecimento acerca da colonização comunitária por BGN-RA, sobretudo sobre a participação e prevalência de genes *mcr* neste cenário.

## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando a grande importância que a resistência aos antimicrobianos possui dentro da sociedade, bem como o papel exercido pelos BGNs como principais responsáveis por IRAS e IAC de caráter grave, juntamente com a ausência de novas opções terapêuticas somado à emergência de resistência bacteriana aos betalactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e a colistina, um dos últimos recursos para o tratamento de infecções por bactérias multirresistentes, é que esse estudo foi projetado.

É sabido que BGN-RAs, dentre eles, os carreadores de *mcr*, não estão restritos aos ambientes hospitalares, sendo constantemente isolados em outros nichos, como rios, lagos, águas costeiras e solo, bem como em animais de companhia, de criação e silvestres e em produtos alimentícios. Ademais, é de grande importância ressaltar que a HGT possui importante papel na manutenção da resistência aos antimicrobianos entre diferentes espécies bacterianas.

No entanto, na literatura científica, há poucos estudos que tenham avaliado a dinâmica da colonização comunitária por BGN-RA. Sendo assim, a investigação da prevalência de colonização comunitária do TGI por BGN resistentes às polimixinas mediada por genes *mcr* possibilita trazer à luz informações importantes acerca da disseminação da resistência, possibilitando o desenvolvimento de medidas de proteção eficazes na prevenção, controle e tratamento de infecções por bactérias resistentes.

### 3. OBJETIVO

Realizar a caracterização quanto à susceptibilidade reduzida às polimixinas de cepas envolvidas com a colonização comunitária do trato gastrointestinal por bacilos gram-negativos de indivíduos atendidos em uma unidade pública de saúde na região metropolitana do Rio de Janeiro.

#### 3.1 Etapas

- Determinar as espécies de BGN capazes de crescer sob pressão seletiva por colistina envolvidas na colonização comunitária do TGI;
- Confirmar a capacidade de manutenção do metabolismo frente à colistina nas espécies isoladas que não são intrinsecamente resistentes a esse antimicrobiano;
- Acessar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras que mantêm o metabolismo frente à colistina;
- Pesquisar a presença de genes *mcr* nas amostras estudadas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Desenho do estudo

O presente estudo envolveu a investigação da caracterização microbiológica de estirpes com suscetibilidade reduzida à colistina relacionadas à colonização comunitária do trato gastrointestinal na região metropolitana do Rio de Janeiro. Para isso, os indivíduos atendidos na emergência de um Hospital público, cederam por autocoleta um *swab* retal. O material cedido pelos participantes da pesquisa foi submetido a um controle de viabilidade celular seguido de pressão seletiva em colistina. As bactérias recuperadas foram identificadas seguida de sua estocagem e pesquisa fenotípica quanto sua susceptibilidade à colistina. Essa pesquisa foi realizada para espécies bacterianas diferentes daquelas intrinsecamente resistentes à colistina, como *Acinetobacter* spp, *Morganella* spp, *Proteus* spp, *Providencia* spp e *Hafnia* spp. Após o teste fenotípico de resistência à colistina, as espécies foram submetidas ao teste de susceptibilidade a outros antimicrobianos, pesquisa dos genes envolvidos com os fenótipos de resistência à colistina obtidos e caracterização do gene plasmidial de resistência através de sequenciamento pela técnica de Sanger. Os detalhes metodológicos de cada etapa são descritos nos itens a seguir.

### 4.2 População incluída no estudo

A população estudada no projeto é composta por indivíduos que foram atendidos na emergência de um hospital público da cidade de Niterói e que não tenham sido hospitalizados nos últimos 6 meses. O convite para participarem do estudo foi realizado e, após o aceite, um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado por cada participante, em **Anexo 9.1**. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Nove de Julho em 28/06/2021, sob número de registro 46762621.2.0000.5455 como consta o **Anexo 9.2**.

### 4.3 Obtenção dos espécimes clínicos

No período entre os meses de fevereiro e março de 2022, foram incluídos no estudo os pacientes que aceitaram participar da pesquisa. Eles foram instruídos a coletar e fornecer amostras de *swab* retal. As amostras armazenadas em meio de transporte Cary-Blair (FirstLab, Paraná, Brasil) por até 60 horas. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) localizado no Departamento de Microbiologia Médica (DMM) no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

### 4.4 Processamento dos espécimes clínicos

Após o recebimento dos espécimes, os *swabs* foram confrontados quanto à sua viabilidade através de sua semeadura em placas de Petri (90x15mm) contendo 20 mL de ágar TSA (Difco, Michigan, EUA) sem antimicrobianos. Para isto, as placas foram divididas em quadrantes onde cada *swab* foi inoculado em *spot*. Em seguida, as placas foram incubadas a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 horas, em aerobiose.

As amostras com crescimento foram submetidas à pressão seletiva frente às polimixinas com o objetivo de isolar as espécies com susceptibilidade reduzida ao antimicrobiano. Para isto, cada *swab* foi semeado em placas de petri (90x15mm) contendo 20 mL de ágar MacConkey acrescidos de sulfato de colistina na concentração de  $3,5\mu\text{g}/\text{mL}$ . As placas semeadas foram incubadas novamente a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 horas, em aerobiose. Após esse período, um representante de cada morfotipo das amostras que apresentaram crescimento na presença de colistina foi selecionado para estudos posteriores. Culturas puras dessas estirpes foram armazenadas em meio de cultura *Skim Milk* (Difco, Michigan, EUA) acrescido de 20% de glicerol (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil) a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 4.5 Identificação das amostras

A identificação das espécies bacterianas foi realizada por MALDI-TOF MS (do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*). Nesta etapa, cada colônia isolada foi depositada nos poços da *sample target*, uma placa metálica fornecida pelo fabricante (Bruker Daltonics, Massachusetts, EUA) do equipamento, com auxílio de palitos de madeira estéreis. Em seguida, foi adicionado 1 $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 70%

(v/v) a cada poço da placa e, após a secagem em temperatura ambiente, foi adicionado 1  $\mu$ L da solução matriz composta por ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) a cada poço. Através dos espectros obtidos pelo detector do aparelho MALDI-TOF Microflex LT, foi gerado um *score* pelo *software* Biotyper 3.1, referente a cada amostra analisada. As espécies bacterianas foram identificadas a partir da pontuação gerada. Nesta etapa, somente foram consideradas confiáveis identificações quanto ao gênero e espécie bacteriana aquelas que apresentaram *score*  $\geq 2.3$ . As amostras que apresentaram *score* entre 1.9 e 2.299 indicaram identificação somente quanto ao gênero.

#### 4.6 Teste rápido de Polimixina NP

Para a detecção fenotípica de resistência às polimixinas foi realizado o teste rápido de Polimixina NP para todas as amostras estudadas, com exceção daquelas com resistência intrínseca (Nordmann, Poirel e Jayol, 2016). Ele é baseado na detecção da fermentação da glicose pelas bactérias em crescimento na presença de uma concentração pré-definida de colistina. A formação de metabólitos ácidos liberados durante a fermentação é observada através da mudança de cor de uma solução como resposta a alteração e pH indicada pelo vermelho de fenol. Para isto, a técnica utiliza duas soluções: solução rápida de Polimixina NP e uma solução estoque de colistina, descritas abaixo.

##### 4.6.1 Preparo das soluções

Para a produção de 100mL da solução rápida de polimixina NP, foi realizada uma mistura de 2,1g de meio de cultura caldo Mueller Hinton (Difco, Michigan, EUA) e 0,0050g do indicador de pH vermelho de fenol (Sigma Aldrich) em 90mL de água destilada em uma garrafa de vidro. O pH da solução foi ajustado para 6,7 respeitando a faixa de variação referente ao vermelho de fenol (6,7 a 8,2), com solução de ácido clorídrico (HCl) 1M. Em seguida, a solução foi autoclavada a 121°C durante 15 minutos. Após seu resfriamento, foi adicionado à solução 10 ml de glicose D (+) anidra a 10% esterilizada por filtração em membrana de porosidade 0,22  $\mu$ m (BIOFIL R).

Para preparo da solução estoque de colistina, foi preciso realizar o cálculo de potência do antimicrobiano, conforme estabelecido pelo CLSI (do inglês, *The Clinical & Laboratory Standards Institute*) (2021) e no estudo de referência para o teste (Nordmann, Poirel e Jayol, 2016), que determina que cada unidade/mg de potência da colistina seja multiplicada por

0,03333  $\mu\text{g}$ /unidades. O sulfato de colistina (Sigma Aldrich) utilizado no presente estudo apresenta uma potência de 15.000 unidades/mg, logo, 500  $\mu\text{g}$ /mg de colistina. Esse valor ao ser convertido, representa 0,5 mg de sulfato de colistina em cada mg de sal do antimicrobiano. O sulfato de colistina foi pesado em uma balança analítica (Sartorius). Para obtenção da concentração final de 0,2 mg/ml da solução estoque, foram diluídos 0,0020 g de sulfato de colistina em 500  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller Hinton também acrescido do indicador de pH e glicose como descrito na solução rápida. Por fim, foi misturado em um tubo do tipo Falcon, 4488,75  $\mu\text{L}$  da solução rápida de polimixina acrescido de 11,25  $\mu\text{L}$  da solução estoque de colistina.

#### 4.6.2 Distribuição das soluções e dos inóculos bacterianos na placa de 96 poços

O teste Polimixina NP foi realizado em uma placa de poliestireno de 96 poços, estéril e com tampa. Com o auxílio de uma pipeta, foi adicionado aos poços controles da placa cerca de 150  $\mu\text{L}$  da solução de polimixina NP livre de colistina. Aos poços testes foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  da solução de polimixina NP acrescidas de colistina (solução estoque de colistina), de modo que tivesse 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de colistina, como descrito anteriormente.

O volume final da solução em cada poço foi de 200  $\mu\text{L}$  de modo que fosse adicionado em duplicata de maneira paralela 150  $\mu\text{L}$  da solução de polimixina NP com e sem colistina juntamente a 50  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana, de modo que a cada dois poços tivesse uma amostra teste. A suspensão bacteriana foi preparada a partir do inóculo bacteriano de cada amostra cultivada overnight em placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton. As colônias foram então dissolvidas em 10 mL de solução salina estéril (NaCl a 0,85%) para obter uma turvação correspondente a 3,0 na escala McFarland (aproximadamente 109 UFC/mL).

A distribuição das suspensões na placa de 96 poços foi repetida em duplicata para todas as amostras testadas bem como para as amostras controles. Como controle positivo foi utilizado uma cepa de *E. coli* produtora de *mcr-1* (C153) e como controle negativo, outra cepa de *E. coli* (J53). Para verificar a esterilidade das soluções utilizadas, foi adicionado em um dos poços 50  $\mu\text{L}$  de solução salina (NaCl) no lugar da suspensão bacteriana. Posteriormente à homogeneização das soluções testes às suspensões bacterianas, a placa foi incubada em estufa por 4 horas à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .



### 4.6.3 Leitura do teste Polimixina NP

Nessa técnica, a resistência à colistina é detectada por meio da metabolização da glicose associada ao crescimento bacteriano na presença de concentrações definidas de colistina ou de polimixina B. O resultado é observado pela formação de metabólitos ácidos liberados durante o crescimento bacteriano, evidenciado pela mudança de cor da solução, ocasionada pela alteração de pH indicado pelo composto vermelho de fenol.

Após o período de 4 horas o resultado foi interpretado, e essa leitura foi repetida a cada 1 hora até completar 4 horas de incubação. Testes positivos foram representados através do crescimento bacteriano nas placas acrescidas com colistina, indicando resistência ao antimicrobiano. Os testes negativos foram representados pela ausência do crescimento bacteriano nos poços acrescidos com colistina, indicando susceptibilidade da amostra ao antimicrobiano.

O crescimento bacteriano foi representado pela alteração de cor dos poços. Isto é, durante seu crescimento, as bactérias liberam metabólitos ácidos, derivados do metabolismo da glicose que tornam o meio externo ácido. Essa alteração de pH foi detectada pelo vermelho de fenol (indicador de pH). Desta forma, a passagem de cor laranja (coloração inicial) para amarelo nos poços indicou crescimento bacteriano na presença de colistina, apontando resistência ao antimicrobiano. Caso a cor da solução presente no poço permanecesse laranja, representaria a ausência do crescimento bacteriano, indicando a sensibilidade da amostra. No entanto, caso ocorresse a alteração na cor do poço de laranja para vermelho, indicaria resultados inconclusivos.

Além disso, nos poços acrescidos com NaCl no lugar da suspensão bacteriana, deveriam permanecer na cor laranja, ou seja, com resultado negativo (ausência de mudança de cor), o que indicaria ausência de contaminação e, portanto, a confiabilidade dos testes.

## 4.7 Antibiograma

A determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizada para as amostras com resultados positivos ao teste PoliNP, por disco difusão em ágar (CLSI, 2021). Para isto, foram preparadas suspensões bacterianas em 3mL de solução salina 0,85%, com cultura pura recente de cada amostra, padronizadas de acordo com a escala 0,5 de McFarland o que corresponde a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Essas suspensões foram semeadas com auxílio de *swabs* estéreis de forma confluenta em placas de Petri (90x15mm) contendo

45 mL de ágar Mueller-Hinton. foram utilizados os discos (Cefar, São Paulo, Brasil): amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg), ácido nalidíxico (30 µg), amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), aztreonam (30 µg), cefepima (30 µg), ceftazidima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), ertapenem (10 µg), fosfomicina (200 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), sulfametoxazol/trimetoprima (23,75/1,25 µg) e tetraciclina (30 µg). As cepas *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram utilizadas como amostras controles. A placa foi incubada a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 horas em aerobiose (Jarlier *et al.*, 1988). O resultado foi interpretado de acordo com as recomendações do CLSI (2021).

#### 4.8 Detecção dos genes *mcr*

A fim de confirmar o genótipo de resistência plasmidial às polimixinas para as variantes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* (Rebelo, et al, 2018), *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9* e *mcr-10*, foi realizada a PCR multiplex (do inglês, *polymerase chain reaction*) de todas as amostras positivas ou negativas para o Teste rápido de polimixina NP, como exemplificado na **Tabela 1**. O DNA bacteriano foi obtido através do preparo de suspensões a partir de cada amostra isolada em 100 µL de água destilada estéril. Desta forma, as espécies bacterianas foram repicadas em placas de Petri contendo 20ml de ágar MacConkey e incubadas a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 horas, em aerobiose. Após esse período, foi promovido a suspensão de cada amostra em microtubos contendo 100 µL de água destilada estéril.

**Tabela 1** - Iniciadores utilizados na reação de PCR multiplex, para a detecção dos genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9* e *mcr-10*.

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Gene alvo	Tamanho do produto (pb) <sup>c</sup>	Condições de ciclagem
mcr-1_F <sup>a</sup> mcr-1_R <sup>b</sup>	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	<i>mcr-1</i>	320	Desnaturação inicial: 25 ciclos de 94°C/30'' 58°C/90'' - 72°C/60''
mcr-2_F mcr-2_R	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT TCTAGCCCGACAAGCATAACC	<i>mcr-2</i>	715	Extensão final:
mcr-3_F mcr-3_R	AAATAAAAATTGTTCCGCTTA TG	<i>mcr-3</i>	929	

AATGGAGATCCCCGTTTTT		72°C/10'	
mcr-4_F	TCACTTTCATCACTGCGTTG	<i>mcr-4</i>	1.116
mcr-4_R	TTGGTCCATGACTACCAATG		
mcr-5_F	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	<i>mcr-5</i>	1.644
mcr-5_R	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG		
mcr-6_F	CGATGCTATTGATTACTGTGC	<i>mcr-6</i>	769
mcr-6_R	GCTGGATACGCTTGACCG		
mcr-7_F	GTGGTCTGGAACATGTCC	<i>mcr-7</i>	485
mcr-7_R	CCAACTATGTCAACGGCATC		
mcr-8_F	GTGGTGGTTGGCGCATAT	<i>mcr-8</i>	671
mcr-8_R	GCAATGCAGGGTGATGCG		
mcr-9_F	GTGCTGGCATCGTTGAGT	<i>mcr-9</i>	300
mcr-9_R	TCGCGTGATACCAATGCT		
mcr-10_F	CGATATCCTGAGCCGTCT	<i>mcr-10</i>	971
mcr-10_R	GCTATGACGATGTTATGCTGG		

<sup>a</sup> F - Forward.

<sup>b</sup> R - Reverse.

<sup>c</sup> Pb - Pares de base.

Para um volume final de 24 µL, foram utilizados 10 µL de tampão 2x GoTaq G2 Green Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA), 3 µL de água ultrapura estéril, 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador na concentração de 10 µM e 1 µL de suspensão bacteriana a ser testada.

As condições de ciclagem para a amplificação dos diferentes genes *mcr* seguiram aquelas utilizadas e estabelecidas previamente por Rebelo e colaboradores (2018). Como controle positivo, foram utilizadas as cepas *E. coli* 2012-60-1176-27 carreadora de *mcr-1*; *E. coli* KP37 carreadora de *mcr-2*; *E. coli* 2013-SQ352 carreadora de *mcr-3*, *E. coli* DH5 carreadora de *mcr-4*; *Salmonella Paratyphi* B dTa+ 13-SA01718 carreadora do gene *mcr-5* e a amostra *E. cloacae* carreadora do gene *mcr-9* (Rebelo et al, 2018).

Com o objetivo de confirmar a amplificação dos genes de interesse, foi realizada a eletroforese dos produtos obtidos na reação de PCR em gel agarose a 1,5% (p/v) contendo brometo de etídio (0,5%) (Sigma, St Louis, EUA) preparado em tampão TBE 0,5x, como descrito por Sambrook e Russell (2001). Como controle do tamanho molecular foi utilizado 2 µL de um marcador de 100pb DNA Ladder (Promega, Wisconsin, EUA). Uma cuba horizontal contendo tampão TBE a 0,5x foi utilizada como recipiente para as corridas de eletroforese em 80 volts durante 45 minutos. Os géis foram revelados por exposição à

radiação UV com o auxílio do fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brasil).

Cada BGN positivo para *mcr* à PCR multiplex, tiveram os resultados confirmados através de PCR *simplex*, específico para cada gene detectado no multiplex. O DNA foi obtido por suspensões bacterianas como descrito no item 4.8. Um microlitro de cada suspensão bacteriana preparada foi adicionada a 5  $\mu$ L de GoTaq® Green Master Mix (Promega, São Paulo, Brasil), 1  $\mu$ L de cada iniciador na concentração de 10 $\mu$ M e 3  $\mu$ L de água ultrapura estéril a fim de atingir um volume final da reação de 10  $\mu$ L. Em seguida, os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese como descrito no item 4.8.1 nos casos em que foi observada a amplificação de produto compatível com o tamanho esperado, foi realizado o sequenciamento do produto.

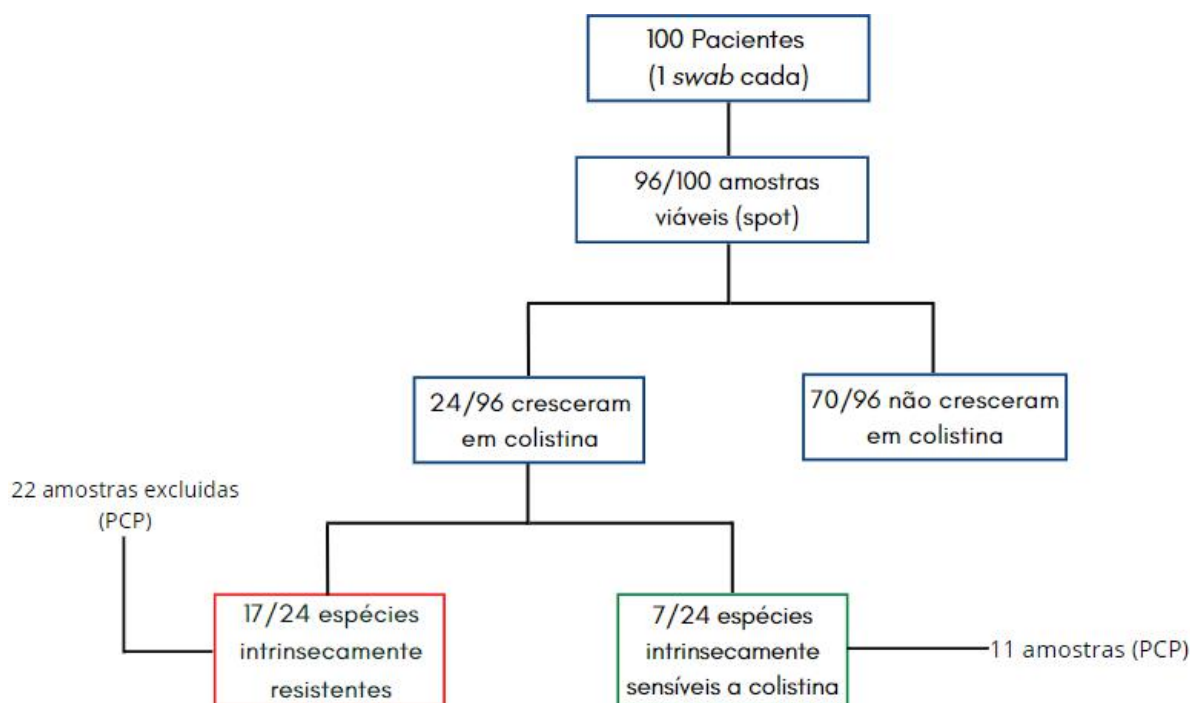
Para o sequenciamento, foi realizada uma nova PCR que teve como volume final 20  $\mu$ L e foi utilizado para cada amostra 12,5  $\mu$ L de GoTaq® colorless (Promega, São Paulo, Brasil), 10 pmol (1  $\mu$ L) de cada oligonucleotídeo iniciador F/R (solução a 10 pmol/ $\mu$ L), 5,5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O livre de DNase (Uniscience) e 1  $\mu$ L de DNA. O produto amplificado foi purificado com o auxílio de ExoSAP - IT® (Affymetrix™, Califórnia, EUA), uma exonuclease I (Exo I) combinada com a fosfatase alcalina Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP). Para cada 5  $\mu$ L de amplicon foram adicionados 2  $\mu$ L de ExoSAP - IT® e a mistura foi submetida à termociclagem (37 °C/15min, 80 °C/15min). Após a etapa de purificação, a amostra foi preparada seguindo as recomendações para sequenciamento, das fitas *forward* e *reverse*, pelo método de Sanger - ABI 3130 XL realizado na Unidade Multidisciplinar de Genômica Darcy Fontoura de Almeida no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF). As sequências consenso foram obtidas após análise pelo software CHROMAS e foram submetidas ao BLASTn (do inglês, *Basic local alignment Search Tool nucleotide*).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Obtenção e processamento dos espécimes clínicos

Foram obtidos 100 espécimes clínicos oriundos de 100 pacientes atendidos na emergência do hospital público, sem histórico de internação nos últimos 6 meses. Durante o processamento dos *swabs*, 96 apresentaram crescimento bacteriano viável em TSA no formato de *spot*.

Dos 96 espécimes positivos para o controle de viabilidade do *swab*, 24 apresentaram crescimento sob pressão seletiva em colistina. Houve casos em que o *swab* de um mesmo indivíduo apresentou mais de uma espécie bacteriana ou morfotipos diferentes da mesma espécie. Desta forma, dos 24 *swabs*, 17 *swabs* apresentaram 22 espécies bacterianas intrinsecamente resistentes ao antimicrobiano e, portanto, foram excluídas deste estudo. Desta forma, 7 *swabs* apresentaram 11 espécies bacterianas intrinsecamente sensíveis, e seguiram para os próximos experimentos, como exemplificado na **figura 3**.



**Figura 3: Fluxograma do processamento dos espécimes clínicos e resultados obtidos nas culturas.**

## 5.2 Identificação das amostras

Obtivemos um total de 22 amostras intrinsecamente resistentes, sendo as mais encontradas: *Morganella morganii* (n = 11); *Hafnia alvei* (n = 7); *Proteus mirabilis* (n = 2); *Providencia rettgeri* (n = 1) e *Acinetobacter colistiniresistens* (n = 1). Quanto a espécies bacterianas com resistência adquirida, obtivemos 11 amostras e as mais frequentes foram: *E. coli* (n = 9) e *K. pneumoniae* (n = 2).

**Tabela 2** - Dados de identificação de cada amostra estudada.

	<b>Código do indivíduo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Número de amostras estocadas</b>
<b>Resistência intrínseca</b>	CP015	<i>A. colistiniresistens</i>	1
	CP027, CP047, CP049, CP050, CP054, CP087 e CP096	<i>M. morganii</i>	11
	CP029, CP043, CP045, CP046, CP053 e CP095	<i>H. alvei</i>	7
	CP035	<i>P. rettgeri</i>	1
	CP057 e CP086	<i>P. mirabilis</i>	2
	<b>Resistência adquirida</b>	CP018, CP020, CP051, CP053, CP097 e CP099	<i>E. coli</i>
		<i>E. coli</i>	2
CP028		<i>K. pneumoniae</i>	2

Ao serem estocadas, as amostras isoladas de cada *swab* obteve a nomeação: Projeto colonização colistina (PCP) seguida de sua nova numeração de acordo com o código do participante da pesquisa ao qual pertencia, como representado na **Tabela 3**.

**Tabela 3** - Amostras estocadas de acordo com cada *swab* processado.

<b>Código do indivíduo</b>	<b>Nomeação estoque</b>	<b>Espécie bacteriana</b>
CP 018	PCP 2	<i>E. coli</i>
	PCP 6	<i>E. coli</i>
CP 028	PCP 7	<i>E. coli</i>
	PCP 8	<i>E. coli</i>
	PCP 9	<i>K. pneumoniae</i>
	PCP 10	<i>K. pneumoniae</i>
CP 020	PCP 11	<i>E. coli</i>
CP 051	PCP 19	<i>E. coli</i>
CP 053	PCP 24	<i>E. coli</i>
CP 097	PCP 30	<i>E. coli</i>
CP 099	PCP 31	<i>E. coli</i>

### 5.3 Teste Rápido de Polimixina NP

Como resultado, 54% das amostras testadas apresentaram fenótipo positivo durante o teste PoliNP, 4 cepas de *E. coli* e 2 cepas de *K. pneumoniae*; enquanto 46% apresentaram resultado negativo, sendo 5 cepas de *E. coli*. Após 1 hora de incubação, 100% (11) das amostras aplicadas nos poços acrescidos da solução estoque ausente de colistina conseguiram metabolizar a glicose presente na solução, o que foi demonstrado pelo indicador de pH através da mudança de cor vermelha para laranja nos poços.

Já para os poços contendo a solução rápida de polimixina acrescida de colistina, 90% (10) das amostras após 1 hora de incubação foram capazes de, em um primeiro momento, metabolizar a glicose presente na solução, mesmo na presença da droga. No entanto, após 2 horas de incubação, as amostras sensíveis a colistina parecem não mais suportá-la, retornando a cor laranja da solução presente no poço, tendo como prevalência 54% (6) de baixa susceptibilidade à droga, e permaneceu dessa forma após mais 2 horas de incubação. Como

resultado negativo, 46% (5) das amostras não foram capazes de metabolizar a glicose presente na solução em contato com a colistina como representado na **tabela 4**. Por fim, as amostras com susceptibilidade reduzida a polimixina identificadas através do Teste PoliNP representam 6,25% dentre os 96 swabs analisados durante o projeto.

**Tabela 4** - Resultados do Teste PoliNP.

<b>Amostra</b>	<b>Código indivíduo</b>	<b>Resultado PoliNP</b>	<b>Espécie bacteriana</b>
PCP 2	CP 018	+	<i>E. coli</i>
PCP 6		+	<i>E. coli</i>
PCP 7		-	<i>E. coli</i>
PCP 8		-	<i>E. coli</i>
PCP 9	CP 028	+	<i>K. pneumoniae</i>
PCP 10		+	<i>K. pneumoniae</i>
PCP 11	CP 020	+	<i>E. coli</i>
PCP 19	CP 051	-	<i>E. coli</i>
PCP 24	CP 053	+	<i>E. coli</i>
PCP 30	CP 097	-	<i>E. coli</i>
PCP 31	CP 099	-	<i>E. coli</i>

#### 5.4 Antibiograma

Todas as 6 amostras positivas para o teste PoliNP apresentaram susceptibilidade à ampicilina, amicacina, amoxicilina/ac.clavulânico, aztreonam, cefepima, ceftazidima, ceftriaxona, fosfomicina, gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim, ciprofloxacino, ácido nalidíxico, meropenem, cloranfenicol, imipenem e ertapenem. Quanto à tetraciclina, 2 das amostras apresentaram resistência ao antimicrobiano: PCP 2 e PCP 6, ambas *E. coli*, representando 2,09% de resistência a tetraciclina dentre os 96 swabs analisados.



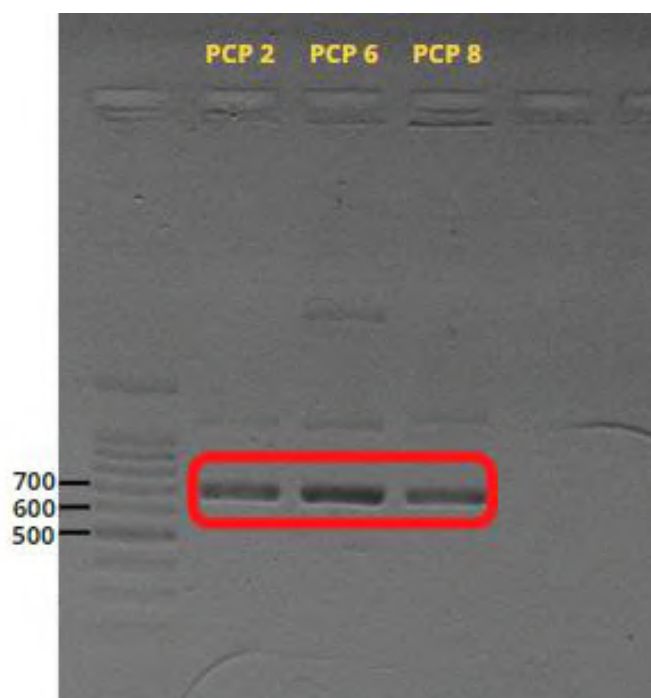
## 5.5 Pesquisa por genes *mcr*

A detecção de *mcr* foi realizada através de PCR multiplex e simplex. A PCR foi realizada para 9 amostras de *E. coli* oriundos de 7 pacientes (CP018; CP020; CP028; CP051; CP053; CP097 e CP099) e 2 amostras identificadas como *K. pneumoniae* oriunda do paciente CP028. Destes, 2 amostras (PCP 2 e PCP 6) isoladas do paciente CP018 e 1 amostra (PCP 8) isolada do paciente CP028 (ambas identificadas como *E. coli*) apresentaram amplificação de fragmento com tamanho semelhante ao esperado para o gene para *mcr-8*, na abordagem de PCR multiplex. As demais amostras testadas apresentaram resultado negativo para todas as variantes investigadas, como mostra a **tabela 5**.

**Tabela 5** - Dados referentes ao resultado da PCR multiplex para pesquisa de genes *mcr*.

Código do indivíduo	Espécie bacteriana	PCR	Código da amostra no estoque
CP018	<i>E. coli</i>	<i>mcr-8</i>	PCP 2 e PCP 6
CP020	<i>E. coli</i>	negativo	PCP 11
CP028	<i>E. coli</i>	<i>mcr-8</i>	PCP 8
	<i>K.pneumoniae</i>	negativo	PCP 9 e PCP 10
CP051	<i>E. coli</i>	negativo	PCP 19
CP053	<i>E.coli</i>	negativo	PCP 24
CP097	<i>E. coli</i>	negativo	PCP 30
CP099	<i>E.coli</i>	negativo	PCP 31

Em seguida, as amostras positivas para a PCR multiplex (PCP 2, PCP 6 e PCP 8), foram submetidas à PCR simplex direcionada somente à variante *mcr-8* para confirmar o seu perfil genotípico. Devido à ausência do controle positivo para *mcr-8* em nosso laboratório, utilizamos como referência para os resultados do teste o padrão de tamanho molecular de 100pb utilizado durante a eletroforese. Como resultado, ao revelar o gel durante a eletroforese, as três amostras se amplificaram de forma notável para o gene *mcr-8*. O tamanho esperado do amplicon *mcr-8* foi de 671 pb, enquanto nossas amostras permaneceram em torno de 600-700 pb, como mostra a **figura 4**.



**Figura 4** - Gel referente a corrida *simplex* para *mcr-8*.

### 5.6 Sequenciamento das amostras positivas para *mcr*

Os resultados do sequenciamento mostraram que as três amostras (PCP 2, PCP 6 e PCP 8) supostamente positivas para *mcr-8* durante a etapa de PCR, na verdade, não possuem o gene plasmidial de resistência à colistina. Nas três amostras, o sequenciamento indicou que os primers para *mcr-8* anelaram inadequadamente em dois genes cromossomiais expressos por algumas cepas de *E. coli*, tendo sua amplificação anelada inicialmente ao gene *cbrA* e terminando no gene *msf transporter*. O sequenciamento revelou identidade de 99% em 98% de cobertura com os alelos analisados.

## 6. DISCUSSÃO

O aumento de resistência aos carbapenêmicos entre BGN fez das polimixinas importantes fármacos em um cenário com poucas opções terapêuticas. A resistência bacteriana à colistina emergiu, tornando-se um grave problema de saúde pública, (Park *et al.*, 2011; Stefaniuk e Tyski, 2019). A colonização intestinal comunitária por BGN com susceptibilidade reduzida às polimixinas pode ser uma porta de entrada e transporte para que esses microrganismos alcancem os ambientes hospitalares, locais onde se encontram indivíduos suscetíveis às infecções. No entanto, há poucos estudos no Brasil que busquem entender qual o papel que esses indivíduos possuem na disseminação desses microrganismos. No presente estudo, identificamos a ocorrência de 6,25% de colonização por BGN com baixa susceptibilidade à colistina, além da presença de duas amostras resistentes à tetraciclina, dentre os 96 voluntários estudados. Entretanto, não identificamos a presença de genes *mcr* em nenhuma das espécies bacterianas investigadas.

São poucos os estudos na literatura que buscam avaliar a colonização comunitária por BGN resistentes à colistina. A maioria dos estudos se concentra em indivíduos internados, ignorando o potencial de disseminação extra-hospitalar desses microrganismos. Budel e colaboradores analisaram, entre junho e julho de 2018, a colonização intestinal por enterobactérias resistentes a cefalosporinas e colistina em funcionários de hotéis na ilha de Zanzibar, na Tanzânia. Foi observado que 66% dos 59 voluntários estudados eram colonizados por espécies como *E. coli* e *K. pneumoniae* resistentes à colistina, sendo 18,7% microrganismos carreadores de *mcr-1*. Além disso, foi observado que 91,5% e 54,2% dos voluntários se mostraram colonizados por *E. coli* e *K. pneumoniae* resistentes às cefalosporinas, respectivamente (Büdel et al, 2019). A prevalência elevada de colonização por BGN resistentes à colistina na Tanzânia pode ser explicada, ao menos em parte, por ser um país de baixa renda, pouco desenvolvido, que possui infraestrutura de saneamento básico precária, e onde o uso de antimicrobianos não é controlado, sendo comum sua administração sem prescrição médica (Büdel et al, 2019). Ademais, é preciso chamar atenção que os voluntários estudados eram funcionários de hotéis, os quais possuem frequente contato com indivíduos de diferentes regiões do mundo, aumentando o risco de aquisição de BGN-RA (Frost et al, 2019).

Outro estudo, conduzido na República Tcheca entre agosto de 2018 e setembro de 2019, buscou investigar a colonização de viajantes tchecos ou indivíduos expatriados por *Enterobacteriaceae* com resistência à colistina mediada por *mcr-1*. Um total de 177 amostras

de fezes foram analisadas. Quinze isolados de *Enterobacteriaceae* (de 14 indivíduos) foram fenotipicamente resistentes à colistina, obtendo-se uma prevalência de transporte de 7,9% (Krutova et al, 2020). A mesma justificativa quanto a alta probabilidade de viajantes adquirirem bactérias resistentes durante viagens pode ser direcionada ao estudo realizado na República Tcheca.

Países como a China também têm frequente ocorrência de colonização por esses microrganismos em indivíduos saudáveis. Em 2017, Hu e colaboradores investigaram a prevalência de *mcr-1* na microbiota intestinal de crianças, na China (Hu et al, 2017). De 173 espécimes fecais, 9,8% foram positivas para resistência à colistina mediada por *mcr-1* em enterobactérias. Outro estudo, também realizado na China em 2018, detectou a prevalência de 4,13% de colonização comunitária por *E. coli* carreadoras de *mcr-1* em 218 residentes rurais (Huang et al, 2021). Parece haver a maior distribuição das diferentes variantes *mcr* na China (Ling et al., 2020). Isso pode ser resultado do grande número de investigações acerca da disseminação de *mcr* em diferentes regiões do país. A segunda justificativa remete ao fato da colistina ter sido amplamente utilizada durante anos como promotor de crescimento em animais de consumo na China e continua a ser utilizada na medicina veterinária (Walsh e Wu, 2016). Cabe ressaltar que a descrição do gene *mcr-1* ocorreu em uma amostra proveniente da China, onde a variante já circulava na década de 1980 (Shen *et al.*, 2016).

Apesar da baixa ocorrência de colonização por esses microrganismos, somado ao fato de nosso número amostral não ter sido suficiente para uma comparação eficaz dentre os estudos citados, nossa pesquisa centraliza a atenção para a necessidade de maiores investigações referente à disseminação desses microrganismos entre populações não internadas. No Brasil, mais precisamente na Região Metropolitana do Rio de Janeiro, às condições de saneamento básico também são consideradas precárias, podendo ter influência na disseminação de bactérias multirresistentes (SNIS, 2020). Grande parte dos estudos realizados no Brasil que buscam analisar a prevalência de resistência à colistina por BGN parecem se restringir a ambientes rurais, principalmente em amostras isoladas de animais de consumo, além de estudos direcionados à disseminação de *mcr* no ambiente (Rabello et al, 2020; Cordeiro-Moura et al, 2022).

Isso pode ser explicado pela pressão seletiva imposta sobre a microbiota intestinal destes animais, devido ao uso durante anos de colistina como promotor de crescimento no Brasil, prática proibida em 2016, mas definitivamente encerrada em meados de 2018 (MAPA, 2016). Viagens internacionais parecem elevar a possibilidade de colonização por esses microrganismos, o que foi reforçado por Tufic-Garutti em 2021, que verificou a aquisição de

enterobactérias multirresistentes em 32% dos viajantes brasileiros estudados, dentre estes, dois indivíduos, ao visitarem o Peru, retornaram colonizados por uma amostra carregando *mcr-1* (Tufic-Garutti et al, 2021). A análise de hábitos dos indivíduos do estudo que inclua informações sobre vivência em área rural e viagens internacionais pode vir a complementar os achados aqui descritos, o que será avaliado em estudos futuros.

As espécies bacterianas com baixa susceptibilidade à colistina mais encontradas foram *E. coli* e *K. pneumoniae*. Apesar da maioria das estirpes de *E. coli* beneficiarem seus hospedeiros impedindo a colonização intestinal por bactérias prejudiciais, o uso extensivo de antimicrobianos fez emergir as cepas resistentes a essas moléculas, dentre elas, a colistina (Leimbach e Dobrindt, 2012). Segundo Nang e colaboradores, as espécies bacterianas com resistência à colistina mediada por *mcr* mais distribuídas mundialmente são *E. coli*, seguida de *S. enterica* e *K. pneumoniae* (Nang, Li e Velkov 2020). Ainda que não tenhamos encontrado genes *mcr*, mais da metade das bactérias recuperadas sob pressão seletiva por colistina apresentaram fenótipo positivo ao teste PoliNP.

Esse resultado pode ser explicado por modificações adaptativas expressas por essas amostras. Como já descrito anteriormente, os BGN possuem uma série de estratégias para sobreviver frente a ação das polimixinas. É o caso do sistema de dois componentes PmrAB e PhoPQ, ativados pela presença de peptídeos catiônicos como a colistina ou como respostas a concentrações alteradas de magnésio, cálcio e ferro no meio externo (Timble *et al.*, 2016). Ao serem ativados, induzem a adição de L-4AraN ou PEtN ao lipídeo A promovendo a alteração de carga do LPS, impedindo sua ligação à colistina (Falagas, Rafailidis e Matthaïou, 2010). Há ainda a superexpressão de bombas de efluxo e proteínas de membrana externa como OprH que permitem a expulsão do fármaco de dentro da célula bacteriana (Falagas, Rafailidis e Matthaïou, 2010). Além disso, espécies como *K. pneumoniae* são capazes de liberar cápsulas constituídas por polissacarídeos para o meio externo, reduzindo a quantidade de colistina que atinge a superfície bacteriana (Olaitan, Morand e Rolain, 2014). Entretanto, não podemos deixar de mencionar a probabilidade dessas amostras possuírem algum mecanismo plasmidial ainda não descrito, ou mesmo uma nova variante de *mcr*. Estudos futuros serão conduzidos visando identificar o mecanismo envolvido nos fenótipos observados.

Duas amostras da espécie *E. coli* isoladas de um mesmo participante apresentaram resistência à tetraciclina. Esse fenótipo pode ser resultante da aquisição de novos genes pela ação de elementos genéticos móveis ou por mutações cromossômicas (Grossman, 2016). Basicamente, os mecanismos bioquímicos da resistência às tetraciclinas envolvem a expressão de bombas de efluxo, proteção ribossômica e inativação enzimática do fármaco (Nguyen et al,

2014). Com o surgimento de fármacos mais eficazes no combate a infecções bacterianas, o uso das tetraciclinas na medicina humana vem diminuindo gradativamente. Porém, elas permanecem sendo um dos principais antimicrobianos utilizados como aditivo alimentar na pecuária, seja como promotor de crescimento e/ou profilaxia de infecções nos rebanhos (FDA, 2019; Peng et al, 2020; OIE, 2020).

A descrição do mecanismo envolvido com a resistência à tetraciclina demonstrada pelas duas amostras mencionadas não foi objetivo deste estudo. Contudo, essas duas amostras foram, coincidentemente, aquelas que apresentaram amplificação inespecífica do gene *mcr-8*. Este anelamento levou à amplificação dos genes *cbra* e *mfs transporter*, conforme descrito nos resultados. MFS transporter é uma superfamília de transportadores de membrana comuns em muitas espécies bacterianas (Fluman e Bibi, 2009). São capazes de expelir um amplo espectro de compostos citotóxicos da célula e, através desta função, tornar as células resistentes a múltiplos fármacos (Edgar e Bibi, 1997; Fluman e Bibi, 2009). O MFS transporter mais descrito em espécies como *E. coli* é o *mdfA*. Este pode estar localizado no cromossomo ou em plasmídeos. Estudos mostram que a superexpressão desses genes, quando em plasmídeos, podem culminar na resistência ao cloranfenicol, eritromicina, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclinas (Edgar e Bibi, 1997; Fluman e Bibi, 2009; Heng et al, 2015). A presença do gene *mfs transporter* nas amostras PCP 2 e PCP 6 poderia, portanto, explicar a resistência à tetraciclina observada. No entanto, essa hipótese não retira a possibilidade das amostras carregarem algum outro mecanismo de resistência ao fármaco.

É interessante ressaltar que apesar das três amostras (PCP 2, PCP 6 e PCP 8) terem o gene *mfs transporter* amplificado no lugar de um possível *mcr-8*, a amostra PCP 8, ao contrário das outras duas, apresentou susceptibilidade à tetraciclina ao antibiograma. Estudos realizados na China em 2013, relatam a resistência a múltiplos fármacos, dentre eles a tetraciclina, em cepas de *E. coli* isoladas de pacientes hospitalizados. Nele foi identificado a superexpressão plasmidial de diferentes genes produtores de proteínas transmembranares, dentre eles, *mdfA* (Wang et al, 2013). O estudo ainda reforça que a sinérgica expressão desses diferentes genes foi o que garantiu a resistência aos fármacos nas amostras analisadas. Desta forma, MFS transporter parece necessitar de um complexo proteico completo para ter funcionalidade e talvez a ausência de algum desses componentes tenha sido um dos motivos para a amostra PCP 8 ter manifestado sensibilidade à tetraciclina. Entretanto, mais e detalhados estudos que busquem analisar o genoma completo dessas espécies são necessários para entender e identificar o mecanismo relacionado a este fenômeno.

O presente estudo apresenta algumas limitações. O número de participantes estudado não é suficiente para refletir a prevalência da colonização comunitária por estirpes com suscetibilidade reduzida às polimixinas. Além disso, em nosso laboratório, o protocolo da PCR para as variantes *mcr-6* a *mcr-10* ainda não foi completamente padronizado devido à ausência das amostras carreadoras dessas variantes que possam ser empregadas como controles positivos nas reações. Ainda que tenhamos testado os iniciadores na expectativa que uma amostra positiva pudesse vir a servir como tal, não podemos garantir que a reação esteja de fato funcionando. A ausência dos controles pode ser um fator relevante na amplificação inespecífica observada para o gene *mcr-8*. Apesar de inúmeras tentativas de correções nas condições de ciclagem da reação, o anelamento inespecífico permaneceu, sendo necessário mais tempo e estudos para a sua padronização. Por último, ressaltamos que a pesquisa da colonização por bactérias resistentes a partir de *swabs* retais não apresenta a mesma sensibilidade que é observada quando do estudo de fezes (Jazmati, Hamprecht e Jazmati, 2021). No entanto, a obtenção de fezes a partir de indivíduos não internados requer uma logística de transporte que não conseguimos alcançar; e esperar pela evacuação dos indivíduos na emergência poderia diminuir a adesão dos pacientes ao estudo. Assim, apesar desta limitação, foi o uso dos *swabs* que tornou o projeto viável.

Nosso trabalho chama a atenção para a necessidade de monitorar a presença de BGN com suscetibilidade reduzida à colistina entre indivíduos não internados. Embora não tenham sido relatados os genes plasmidiais estudados, mais da metade das amostras apresentaram baixa susceptibilidade à colistina, o que nos traz a possibilidade de haver novos mecanismos de resistência e que podem estar localizados em elementos genéticos móveis. Ademais, a detecção da presença de *E. coli* resistentes à tetraciclina nesses indivíduos sinaliza a disseminação de resistência bacteriana a outras classes de antimicrobianos de forma silenciosa entre pessoas da comunidade. Sendo assim, mais estudos são necessários para que se busque avaliar um maior grupo de indivíduos da população não internada do Rio de Janeiro e investigar o papel dos BGN em sua capacidade de adquirir e disseminar genes de resistência à colistina fora do ambiente hospitalar.

## 7. CONCLUSÕES

- *E. coli* e *K. pneumoniae* representaram as espécies mais frequentes na colonização com baixa susceptibilidade a colistina de natureza adquirida;
- Apesar da ausência dos genes plasmidiais pesquisados, mais da metade das amostras estudadas apresentaram capacidade de metabolizar a glicose na presença do antimicrobiano;
- Foi relatado 2,09% de resistência a tetraciclina dentre as amostras com susceptibilidade reduzida a colistina;
- Os genes *mcr* pesquisados não foram detectados entre as amostras estudadas. No entanto, há possibilidade de a reduzida susceptibilidade identificada ser mediada por algum outro mecanismo de resistência, cromossômico ou plasmidial.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AbuOun, M., Stubberfield, E.J., Duggett, N.A., Kirchner, M., Dormer, L., Nunez-Garcia, J., Randall, L.P., Lemma, F., Crook, D.W., Teale, C., Smith, R.P., Anjum, M.F. (2007). *mcr-1* and *mcr-2* variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 2745-2749.
- Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S., e S Gupta, R. (2016) Genome-based phylogeny and taxonomy of the “Enterobacteriales”: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 5575–5599.
- Ahmed, S.M.A.E., Zhong, L.L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., Tian, G.B. (2020) Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerg. Microbes. Infect.* 29, 868-885.
- Alekshun, N.M., e Levy, B.S. (2007). Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance, *Cell* 6, 1037-1050.
- Andrade, B., Goris, T., Afli, H., Coutinho, F. H., Dávila, A., & Cuadrat, R. (2021). Putative mobilized colistin resistance genes in the human gut microbiome. *BMC microbiology*, 21(1), 220.
- ANVISA (2007). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resistência microbiana - Mecanismos de impacto clínico. Mecanismo de resistência bacteriana aos antimicrobianos. Disponível em [https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_web/modulo3/mec\\_permeabilidade.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/mec_permeabilidade.htm). Acesso em 17/08/2021.
- ANVISA (2008). Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Módulo V. 3. Enterobactérias. Disponível em [https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod\\_5\\_2004.pdf](https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004.pdf). Acesso em: 20/09/2021.
- Arzanlou M., Chai W.C., Venter, H. (2017). Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays Biochem.* 61, 49-59.
- Azad, M.A.K., Nation, R.L., Velkov, T., Li, J. (2019) Mechanisms of Polymyxin-Induced Nephrotoxicity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1145, 305-319.
- Babic, M., Hujer, A. M., e Bonomo, R. A. (2006) What’s new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Updates*, 9, 142–156.
- Barbieri, N. L., Pimenta, R. L., de Melo, D. A., Nolan, L. K., de Souza, M., & Logue, C. M. (2021). *mcr-1* Identified in Fecal *Escherichia coli* and Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) From Brazil. *Frontiers in microbiology*, 12, 659613.
- Baron, S., Hadjadj, L., Rolain, J.M., Olaitan, A.O. (2016). Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 48, 583-591.
- Baron, S., Leulmi, Z., Villard, C., Olaitan, A.O., Telke, A.A., Rolain, J.M. (2018). Inactivation of the *arn* operon and loss of aminoarabinose on lipopolysaccharide as the cause of susceptibility to colistin in an atypical clinical isolate of *proteus vulgaris*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 3, 450-457.
- Bartolini, A., Sennati, S., DiMaggio, T., Mantella, A., Riccobono, E., Strohmeyer, M., Revollo, C., Villagran, A.L., Pallecchi, L., Rossolini, G.M. (2016). Antimicrobial susceptibility and emerging resistance determinants (*bla*CTX-M, *rmtB*, *fosA3*) in clinical isolates from urinary tract infections in the Bolivian Chaco. *Int. J. Infect. Dis.* 43, 1-16.

- Bartolletti, F., Seco, B. M., Capuzzo Dos Santos, C., Felipe, C. B., Lemo, M. E., Alves, T., Passadore, L. F., Mimica, M. J., Sampaio, S. C., Zavascki, A. P., & Sampaio, J. L. (2016). Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 22(10), 1849–1851.
- Berkner S., Konradi S., Shonfeld J. (2014). Antibiotic resistance and the environment —there and back again. *EMBO reports* 15, 740-744.
- Bi, Z., Berglund, B., Sun, Q., Nilsson, M., Chen, B., Tärnberg, M., Ding, L., Stålsby Lundborg, C., Bi, Z., Tomson, G., Yao, J., Gu, Z., Yin, X., Kou, Z., & Nilsson, L. E. (2017). Prevalence of the *mcr-1* colistin resistance gene in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* from human faecal samples collected in 2012 in rural villages in Shandong Province, China. *International journal of antimicrobial agents*, 49(4), 493–497.
- Bialvaei, A.Z., Kafil, S.H. (2015). Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr. Med. Res. Opin.* 4, 707-721.
- Biswas, S., Brunel, J.M., Dubus, J.C., Reynaud-Gaubert, M., e Rolain, J.M. (2014). Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 8, 917-934.
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J.A., Hendriksen, R.S., Szabo, I., Malorny, B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 3317-3324.
- Bonkat, G., Pickard, R., Bartoletti, R., Bruyère, F., Geerlings, SE, Wagenlehner, F., & Wullt, B. (2017). Diretrizes da EAU sobre infecções urológicas. *Associação Europeia de Urologia* , 18 , 22-6.
- Braga, I.A., Campos, P.A., Gontijo-Filho, P.P., Ribas, R.M. (2018). Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. *J Hosp Infect.* 3, 318-324.
- Brenner D.J., Farmer, J.J. (2005) Family I. Enterobacteriaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2, 587–607.
- Brolund, A., Sandegren, L. (2016). Characterization of ESBL disseminating plasmids. *Infect. Dis. (ond).* 48, 18-25.
- Büdel, T., Kuenzli, E., Clément, M., Bernasconi, O. J., Fehr, J., Mohammed, A. H., Hassan, N. K., Zinsstag, J., Hatz, C., & Endimiani, A. (2019). Polyclonal gut colonization with extended-spectrum cephalosporin- and/or colistin-resistant Enterobacteriaceae: a normal status for hotel employees on the island of Zanzibar, Tanzania. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 74(10), 2880–2890.
- Bush, Jacoby, G.A., e Medeiros, A.A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1211–1233.
- Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e01076-18.
- Bush, K., e Bradford, P.A. (2016).  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a025247.
- Cajal, Y., Rogers, J., Berg, O.G., Jain, M.K. (1996). Intermembrane Molecular Contacts by Polymyxin B Mediate Exchange of Phospholipids. *Biochemistry.* 1, 299-308.
- Campos, M.A., Vargas, M.A., Regueiro, V., Llompert, C.M., Albertí, S., Bengoechea, J.A. (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 72, 7107-14.
- Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzotti, G., Magistrali, C.F. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 22. 30589.

- Carlet, J. (2012). The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 1, 39.
- Carroll, L.M., Gaballa, A., Guldemann, C., Sullivan, G., Henderson, L.O., Wiedmann, M. (2019). Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *mBio.* 10, e00853-19.
- CDC (2013) Centers For Disease Control And Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States. 114. Disponível em: [ar-threats-2013-508.pdf](https://www.cdc.gov/drugresistance/ar-threats-2013-508.pdf) (cdc.gov). Acesso em 10/08/2021
- CDC (2019). Antibiotic resistance threats in the United States. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: [https://drive.google.com/file/d/1G6iBCbI8auc8qm8w\\_b8WPVkdQg9YVwbg/view](https://drive.google.com/file/d/1G6iBCbI8auc8qm8w_b8WPVkdQg9YVwbg/view) . Acesso em 22/09/2021
- Chan, W.S., Au, C.H., Ho, D.N., Chan, T.L., Ma, E.S., Tang, B.S. (2018). Prospective study on human fecal carriage of Enterobacteriaceae possessing *mcr-1* and *mcr-2* genes in a regional hospital in Hong Kong. *BMC Infect. Dis.* 18, 81.
- Cheng, D., Ngo, H.H., Guo, W., Chang, W.S., Nguyen, D.D., Liu, Y., Wei, Q., Wei, D. (2020). A critical review on antibiotics and hormones in swine wastewater: Water pollution problems and control approaches. *J. Hazard. Mater.* vol. 38.
- Chen, Y., Zhao, Y.J., Shan, X., Huang, L.Y., Han, L. (2017). A point-prevalence survey of healthcare-associated infection in fifty-two Chinese hospitals. *J. Hosp. Infect.* 1, 105-111.
- Clausell, A., Garcia-Subirats, M., Pujol, M., Busquets, A.M., Rabanal, F., Cajal, Y. (2007). Gram-Negative Outer and Inner Membrane Models: Insertion of Cyclic Cationic Lipopeptides. *J. Phys. Chem. B.* 3, 551-563.
- CLSI (2021): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.
- Collignon, P.J., McEwen, S.A. (2019). One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Trop. Med. Infect. Dis.* 4, 22.
- Cordeiro-Moura, J. R., Kraychete, G. B., Longo, L., Corrêa, L. L., da Silva, N., Campana, E. H., Oliveira, C., & Picão, R. C. (2022). Description and comparative genomic analysis of a *mcr-1*-carrying *Escherichia coli* ST683/CC155 recovered from touristic coastal water in Northeastern Brazil. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 97, 105196.
- Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J.L., Igrejas, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J. Med. Microbiol.* 66, 551-559.
- Courvalin, P. (1994). Transfer of Antibiotic Resistance Genes between Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 7, 1447-1451.
- Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., Finlay, B.B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 822-880.
- Cyoia, P. S., Koga, V. L., Nishio, E. K., Houle, S., Dozois, C. M., De Brito, K. C. T., Kobayashi, R. K. T. (2019). Distribution of ExPEC virulence factors, *bla* CTX-M, *fos* A3, and *mcr-1* in *Escherichia coli* isolated from commercialized chicken carcasses. *Frontiers in microbiology*, 9, 3254.
- Davies, J. (2013) Specialized microbial metabolites: functions and origins. *J. Antibiot.* 66, 361–364 .
- Davies, J., Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417-433.
- Davies, J., e Wright, G. (1997). Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol.* 6, 234-240.
- Delcour, A.H. (2008). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1794, 808-816.

Delcour, A.H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1794, 808–816.

Dell'Annunziata, F., Folliero, V., Giugliano, R., De Filippis, A., Santarcangelo, C., Izzo, V., Daglia, M., Galdiero, M., Arciola, C.R., Franci, G. (2021) Gene Transfer Potential of Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1-15.

Departamento de Informática do SUS (2017). Morbidade Hospitalar do SUS - por local de residência - Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>

Deris, Z.Z., Akter, J., Sivanesan, S., Roberts, K.D., Thompson, P.E., Nation, R.L., Li, J., Velkov, T. (2014). A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J Antibiot (Tokyo).* 67, 147-151.

Edgar, R., & Bibi, E. (1997). MdfA, uma proteína de resistência multidroga *Escherichia coli* com um espectro extraordinariamente amplo de reconhecimento de drogas. *Revista de bacteriologia*, 179(7), 2274–2280.

Falagas, M.E., Kasiakou, S.K. (2006). Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit. Care.* 10, R27.

Falagas, M.E., Kasiakou, S.K., Saravolatz, L.D. (2005). Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clin. Infect. Dis.* 9, 1333–1341.

Falagas, M.E., Rafailidis, P.I., Matthaïou, D.K. (2010). Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist. Updat.* 4-5, 132-138.

Falgenhauer, L., Waezsada, S.E., Yao, Y., Imirzalioglu, C., Käsboher, A., Roesler, U., Michael, G.B., Schwarz, S., Werner, G., Kreienbrock, L., Chakraborty, T. (2016). Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect. Dis.* 3, 282-283.

Farra, A., Frank, T., Tondeur, L., Bata, P., Gody, J.C., Onambele, M., Rafai, C., Vray, M., Breurec, S. (2016). High rate of faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthy children in Bangui, Central African Republic. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 891.e1-891.e4.

FDA (2011), Food and Drug Administration. Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals. Washington DC: Department of Health and Human Services.

Fernandes, M. R., Moura, Q., Esposito, F., Lincopan, N., & authors of the original article (2016). Authors' reply: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 21(26), 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30268.

Fernandes, M.R., Moura, Q., Sartori, L., Silva, K. C., Cunha, M. P., Esposito, F., Lopes, R., Otutumi, L. K., Gonçalves, D.D., Dropa, M., Matté, M. H., Monte, D. F., Landgraf, M., Francisco, G. R., Bueno, M. F., de Oliveira Garcia, D., Knöbl, T., Moreno, A. M., & Lincopan, N. (2016). Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 21(17).

Fernandes, M.R., Sellera, F.P., Esposito, F., Sabino, C.P., Cerdeira, L., Lincopan, N. (2017). Colistin-Resistant *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* on Public Beaches, an Infectious Threat Emerging in Recreational Waters. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 61, e00234-17.

Fernández, L., Breidenstein, M.B.E., e Hancock, W.E.R. (2011). Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist. Updat.* 1, 1-21.

Fleming, A. (1929) On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 10, 226–236.

- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews. Microbiology*, 13(5), 269–284.
- Fluman, N., & Bibi, E. (2009). Bacterial multidrug transport through the lens of the major facilitator superfamily. *Biochimica et biophysica acta*, 1794(5), 738–747.
- Friedman N.D., Temkin E., Carmeli Y. (2015). The negative impact of antibiotic resistance. *Clinic. Microbiol. infec.* 22, 416-422.
- Frieri, M., Kumar, K., Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *J. Infec. Public. Health.* 4, 369-378.
- Fritzenwanker, M., Imirzalioglu, C., Herold, S., Wagenlehner, F. M., Zimmer, K.P., Chakraborty, T. (2018). Treatment Options for Carbapenem- Resistant Gram-Negative Infections. *Dtsch Arztebl Int.* 115, 345-352.
- Frost, I., Van Boeckel, T. P., Pires, J., Craig, J., & Laxminarayan, R. (2019). Global geographic trends in antimicrobial resistance: the role of international travel. *Journal of travel medicine*, 26(8), taz036.
- Fu, Y., Zhang, F., Zhang, W., Chen, X., Zhao, Y., Ma, J., Bao, L., Song, W., Ohsugi, T., Urano, T., & Liu, S. (2007). Differential expression of bla(SHV) related to susceptibility to ampicillin in *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of antimicrobial agents*, 29(3), 344–347.
- Furlan, J., Ramos, M. S., Dos Santos, L., Gallo, I., Lopes, R., & Stehling, E. G. (2021). Appearance of mcr-9, blaKPC, cfr and other clinically relevant antimicrobial resistance genes in recreation waters and sands from urban beaches, Brazil. *Marine pollution bulletin*, 167, 112334.
- Gajamer, V.R., Bhattacharjee, A., Paul, D., Ingti, B., Sarkar, A., Kapil, J., Singh, A.K., Pradhan, N., Tiwari, H.K. (2020). High prevalence of carbapenemase, AmpC  $\beta$ -lactamase and aminoglycoside resistance genes in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-positive uropathogens from Northern India. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 20, 197-203.
- Gales, A. C., Jones, R. N., & Sader, H. S. (2006). Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12(4), 315–321.
- Gallo, A., Passaro, G., Gasbarrini, A., Landolfi, R., & Montalto, M. (2016) Modulation of microbiota as treatment for intestinal inflammatory disorders: An uptodate. *World journal of gastroenterology* 22, 7186–7202.
- Garonzik, S. M., Li, J., Thamlikitkul, V., Paterson, D. L., Shoham, S., Jacob, J., Silveira, F. P., Forrest, A., & Nation, R. L. (2011). Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(7), 3284–3294.
- GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators (2018). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(11), 1191–1210. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30310-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30310-4)
- Girardello, R. e Gales, A. C. (2012). Resistência às polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, 2, 66-69.
- Glinka, M., Wojnowski, W., Wasic, A. (2020). Determination of aminoglycoside antibiotics: Current status and future trends. *Trends Analyt. Chem.* 131, 116034.
- Gomes M. (2018). Community-acquired pneumonia: challenges of the situation in Brazil. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*, 44(4), 254–256.
- Guclu, E., Halis, F., Kose, E., Ogutlu, A., & Karabay, O. (2021). Risk factors of multidrug-resistant bacteria in community-acquired urinary tract infections. *African health sciences*, 21(1), 214–219

- Goffin, C., e Ghuysen, J.M. (1998). Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 4, 1079-1093.
- Gooderham, W.J., e Hancock, R.E.W. (2009). Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* 2, 279–294.
- Gough, M., Hancock, R.E., e Kelly, N.M. (1996). Antiendotoxin Activity of Cationic Peptide Antimicrobial Agents. *Infect. Immun.* 12, 4922-4927.
- Grossman T. H. (2016). Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(4), a025387.
- Guarner, F., Malagelada, R.J. (2003) Gut flora in health and disease. *The lancet* 361, 512-519.
- Gunn, J.S. (2001). Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. *J Endotoxin Res.* 7, 57-62.
- Hancock, R.E.W. (1997). Peptide antibiotics. *Lancet* 9049, 418-422.
- Heng, J., Zhao, Y., Liu, M., Liu, Y., Fan, J., Wang, X., Zhao, Y., & Zhang, X. C. (2015). Substrate-bound structure of the *E. coli* multidrug resistance transporter MdfA. *Cell research*, 25(9), 1060–1073.
- Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C., Rogall, E.T., Schwartz, T. (2017). Occurrence of the *mcr-1* Colistin Resistance Gene and other Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Microbial Populations at Different Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany. *Front. Microbiol.* 8, 1282.
- Hooper, D.C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* 31, 24-28.
- Huang, S., Wang, S., Li, Y., Fang, M., Kou, Z., Chen, B., Xu, L., Bi, Z., Xu, H., Chi, X., & Bi, Z. (2021). Prevalence and transmission of mobilized colistin resistance (*mcr-1*) gene positive *Escherichia coli* in healthy rural residents in Shandong province, China. *Microbiological research*, 253, 126881.
- Hu, Y. Y., Wang, Y. L., Sun, Q. L., Huang, Z. X., Wang, H. Y., Zhang, R., & Chen, G. X. (2017). Colistin resistance gene *mcr-1* in gut flora of children. *International journal of antimicrobial agents*, 50(4), 593–597.
- Hutchings, I. M., Truman, W. A., Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology* 51, 72-80.
- Imlay, J.A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol.* 11, 443–454.
- Jazmati, T., Hamprecht, A., & Jazmati, N. (2021). Comparison of stool samples and rectal swabs with and without pre-enrichment for the detection of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacterales (3GCREB). *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 40(11), 2431–2436.
- Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* 21, 8787-8803.
- Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G., e Philippon, A. (1988) Extended broad-spectrum beta-lactamase conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10, 867–878.
- Karanika, S., Karantanos, T., Arvanitis, M., Grigoras, C., Mylonakis, E. (2016). Fecal Colonization With Extended-spectrum Beta-lactamase–Producing Enterobacteriaceae and Risk Factors Among Healthy Individuals: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clin. Infect. Dis.* 3, 310–318.

- Kasiakou, S.K., Michalopoulos, A., Soteriades, E.S., Samonis, G., Sermaides, G.J., Falagas, M.E. (2020). Combination Therapy with Intravenous Colistin for Management of Infections Due to Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria in Patients without Cystic Fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8, 3136-3146.
- Kaye, K.S., Pogue, J.M., Tran, T.B., Nation, R.L., Li, J. (2016). Agents of Last Resort: Polymyxin Resistance. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2, 391-414.
- Kempf, I., Jouy, E., Chauvin, C. (2016). Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int. J. Antimicrob. Agents* 6, 598-606.
- Kepekli, E., Soysal, A., Yalindag-Ozturk, N., Ozgur, O., Ozcan, I., Devrim, I., Akar, S., Bakir, M. (2015). Healthcare-Associated Infections in Pediatric Intensive Care Units in Turkey: A National Point-Prevalence Survey. *Jpn. J. Infect. Dis.* 5, 381-386.
- Kishimbo, P., Sogone, N.M., Kalokola, F., Mshana E.S. (2020) Prevalence of gram negative bacteria causing community acquired pneumonia among adults in Mwanza City, Tanzania. *Pneumonia* 12, 7.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A., Collins, J.J. (2007). A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell* 130, 797-810.
- Kopotsa, K., Sekyere O.J., Mbelle, N.M. (2019). Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 1457, 61-91.
- Kox, L.F., Wösten, M.M., Groisman, E.A. (2000). A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *EMBO J.* 19, 1861-1872.
- Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., e Connolly, L.E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a027029.
- Krutova, M., Kalova, A., Nycova, E., Gelbicova, T., Karpiskova, R., Smelikova, E., Nyc, O., Drevinek, P., & Tkadlec, J. (2021). The colonisation of Czech travellers and expatriates living in the Czech Republic by colistin-resistant Enterobacteriaceae and whole genome characterisation of *E. coli* isolates harbouring the *mcr-1* genes on a plasmid or chromosome: A cross-sectional study. *Travel medicine and infectious disease*, 39, 101914.
- Kubin, C.J., Ellman, T.M., Phadke, V., Haynes, L.J., Calfee, D.P., Yin, M.T. (2012). Incidence and predictors of acute kidney injury associated with intravenous polymyxin B therapy. *J. Infect.* 1, 80-87.
- Kümerer, K. (2001). Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks. In: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. eds. 3 ed. (Uwe Imbrock, Stasch- Verlagsservice, Bayreuth Germany), pp 489-498.
- Kwa, A.L., Tam, V.H., e Falagas, M.E. (2008) Polymyxins: A Review of the Current Status Including Recent Developments. *Ann. Acad. Med.* 10, 870-883.
- Le, P.Q., Awasthi, S.P., Hatanaka, N., Hinenoya, A., Hassan, J., Ombarak, R.A., Iguchi, A., Tran, N., Dao, K., Vien, M. Q., Le, H.X., Do, H.T., Yamamoto, Y., e Yamasaki, S. (2021). Prevalence of mobile colistin resistance (*mcr*) genes in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from retail raw foods in Nha Trang, Vietnam. *Int. J. Food Microbiol.*, 346, 109164.
- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Current topics in microbiology and immunology*, 358, 3–32.
- Lenhard, J. R., Thamlikitkul, V., Silveira, F. P., Garonzik, S. M., Tao, X., Forrest, A., Soo Shin, B., Kaye, K. S., Bulitta, J. B., Nation, R. L., Li, J., & Tsuji, B. T. (2017). Polymyxin-resistant, carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* is eradicated by a triple combination of agents that lack individual activity. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 72(5), 1415–1420.
- Lentz, S. A., de Lima-Morales, D., Cuppertino, V. M., Nunes, L., da Motta, A. S., Zavascki, A. P., Barth, A. L., & Martins, A. F. (2016). Letter to the editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 21(26), 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30267.

- Levy, S., e Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10, 122–129.
- Linares, J.F., Gustafsson, I., Baquero, F., Martinez, J.L. (2006) Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 19484-19489.
- Ling, Z., Yin, W., Shen, Z., Wang, Y., Shen, J., Walsh, T.R. (2020). Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *J. Antimicrob. Chemother.* 11, 3087–3095.
- Liu, L., Chen, X., Skogerbø, G., Zhang, P., Chen, R., He, S., & Huang, D. W. (2012). The human microbiome: a hot spot of microbial horizontal gene transfer. *Genomics*, 100(5), 265–270.
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., & Shen, J. (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet. Infect. Dis.* 16, 161–168.
- Livermore, D.M. (2012). Fourteen years in resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 4, 283-294.
- Lobanovska, M., & Pilla, G. (2017). Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future?. *The Yale J. Biol. Med.* 90, 135–145.
- Loho, T., e Dharmayanti, A. (2015). Colistin: an antibiotic and its role in multiresistant Gram-negative infections. *Acta Med. Indones.* 47, 157-68.
- Lomovskaya, O., Zgurskaya, H., Totrov, M., Watkins, J.W. (2007). Waltzing transporters and 'the dance macabre' between humans and bacteria. *Nat Rev Drug Discov* 6, 56–65.
- Lübbert, C., Straube, L., Stein, C., Makarewicz, O., Schubert, S., Mössner, J., Pletz, M. W., & Rodloff, A. C. (2015). Colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in international travelers returning to Germany. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 305(1), 148–156.
- Lupo, A., Saras, E., Madec, J.Y., Haenni, M. (2018). Emergence of blaCTX-M-55 associated with *fosA*, *rmtB* and *mcr* gene variants in *Escherichia coli* from various animal species in France. *J. Antimicrob. Chemother.* 4, 867–872.
- Luvsansharav, U.O., Hirai, I., Niki, M., Nakata, A., Yoshinaga, A., Yamamoto, A., Yamamoto, M., Toyoshima, H., Kawakami, F., Matsuura, N., Yamamoto, Y. (2013). Fecal carriage of CTX-M  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in nursing homes in the Kinki region of Japan. *Infect. Drug Resist.* 6, 67-70.
- Ly, N. S., Bulman, Z. P., Bulitta, J. B., Baron, C., Rao, G. G., Holden, P. N., Li, J., Sutton, M. D., & Tsuji, B. T. (2016). Optimization of Polymyxin B in Combination with Doripenem To Combat Mutator *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(5), 2870–2880.
- MAPA (2016). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Uso de colistina na pecuária no Brasil. Acesso em: 02/10/2022. Disponível em: [doi1-6 \(www.gov.br\)](https://doi.org/10.1186/14752875-6).
- Marathe, N.P., Pal, C., Gaikwad, S.S., Jonsson, V., Kristiansson, E., Larsson, D.G.J. (2017). Untreated urban waste contaminates Indian river sediments with resistance genes to last resort antibiotics. *Water Res.* 124, 388-397.
- Maris, S.A., Mody, P., Brewer, D.J., Humphries, R.M. (2021). The Fluoroquinolones: An Update for the Clinical Microbiologist. *Clin. Microbiol. Newsl.* 12, 97-107.
- Martin, R.M., Cao, J., Brisse, S., Passet, V., Wu, W., Zhao, L., Malani, P.N., Rao, K., Bachman, M.A. (2016). Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere* 1, e00261-16.
- Martins, C.A., Conceição-Neto, O.C., Oliveira, T.R.T., Dias, C.F., Montezzi, L.F., Picão, R.C., Albano, R.M., Asensi, M.D., Carvalho-Assef, A.P. D'Alincourt. (2017). Emergence of the Plasmid-Mediated *mcr-1* Gene in



- Clinical KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 7, vol 61.
- Martínez-Martínez, L. (2019). Carbapenemases: The never-ending story. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2, 73-75.
- Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Jacoby, G.A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 9105, 797-799.
- Mazzariol, A., Bazaj, A., Cornaglia, G. (2017). Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *Journal of Chemotherapy*, 29, 2-9.
- McEwen, S.A., Fedorka-Cray, P.J. (2020). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.* 3, 93-106.
- McLellan, L. K., & Hunstad, D. A. (2016) Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends Mol. Med.* 22, 946–957.
- Meerveld G.V. B., Johnson A.C., Grundy D. (2017) Gastrointestinal Physiology and Function. In: Greenwood-Van Meerveld B. *Gastrointestinal Pharmacology. Handbook of Experimental Pharmacology* 239, 1-16.
- Mehrad B., Nina M. Clark, George G. Zhanel, Joseph P. Lynch. (2015). Antimicrobial Resistance in Hospital-Acquired Gram-Negative Bacterial Infections. *Chest* 147, 1413-1421.
- Mikhayel, M., Leclercq, S.O., Sarkis, D.K., e Doublet, B. (2021). Occurrence of the Colistin Resistance Gene *mcr-1* and Additional Antibiotic Resistance Genes in ESBL/AmpC-Producing *Escherichia coli* from Poultry in Lebanon: A Nationwide Survey. *Microbiol. Spectr.* 2021, e0002521.
- Moffatt J.H., Harper M., Boyce J.D. (2019). Mechanisms of Polymyxin Resistance. In: Li J., Nation R., Kaye K. (eds) *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside. (Advances in Experimental Medicine and Biology)* vol 1145, pp. 55-71.
- Moreno, L. Z., Gomes, V., Moreira, J., de Oliveira, C. H., Peres, B. P., Silva, A., Thakur, S., La Ragione, R. M., & Moreno, A. M. (2019). First report of *mcr-1*-harboring *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolated from poultry meat in Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 93(4), 376–379.
- Murray, P.R. (2014). *Microbiologia Médica*. In: Elsevier. 7 ed. (Rio de Janeiro), pp. 484-487.
- Nang, S.C., Li, J., e Velkov, T. (2019). The rise and spread of *mcr* plasmid-mediated polymyxin resistance. *Crit. Rev. Microbiol.* 45, 131-161.
- Netzker, T., Flak, M., Krespach, K.C.M., Stroe, C.M., Weber, J., Schroeckh, V., Axel A Brakhage, A.A. (2018) Microbial interactions trigger the production of antibiotics. *Curr. Opin. in Microbiol.* 45, 117-123.
- Nguyen, F., Starosta, A. L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., & Wilson, D. N. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological chemistry*, 395(5), 559–575.
- Nicolau, D.P. (2008). Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opin. Pharmacother.* 9, 23-37.
- Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 593–656.
- Nnadozie, C.F., e Odume, O.N. (2019). Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Environ. Pollut.* 254, 113067.
- Nordmann, P., Jayol, A., Poirel, L. (2016). Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1038-1043.
- Olaitan, A.O., Morand, S., Rolain, J.M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00643.

Oliveira, C.C., Lopes, S.E., Barbosa, R.D., Pimenta, L.R., Sobrinho, A.B.M.N., Coelho, O.M.S., Souza, S.M.N. & Coelho, S.I. (2019). Occurrence of the colistin resistance *mcr-1* gene in soils from intensive vegetable production and native vegetation. *British Society of Soil Science*. 70, 876-881.

Oliveira, J., e Reygaert, W.C. (2021). Gram Negative Bacteria. In: StatPearls. Treasure Island. StatPearls.

Pampa-Saico, S., Pintado, V., Muriel, A., Caravaca-Fontan, F., Yerovi-Léon, E., Rojo-Sanchis, A., Delrey, J.M., Tenorio, T., Liaño, F. (2020). Colistimethate sodium and acute kidney injury: Incidence, risk factors, outcome and prognosis of renal function. *Nefrologia*. 6, 579-690.

Pan, M., Chu, L.M. (2018). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in soils from wastewater irrigation areas in the Pearl River Delta region, southern China. *Sci. Total Environ*. 624, 145-152.

Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob. Agents Chemother*. 55, 4943-4960.

Park, Y.K., Choi, J.Y., Shin, D., Ko, K.S. (2011). Correlation between overexpression and amino acid substitution of the *PmrAB* locus and colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 37, 525-30.

Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C. and Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 70, 5607-5612. Disponível em <<https://www.bacterio.net/>> Acesso em: 29/09/2021.

Peleg, Y.A., Hooper, C.D. (2010) Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N. Engl. J. Med*. 362, 1804-1813.

Pereira, C.A., Marra, A.R., Camargo, L.F., Pignatari, A.C., Sukiennik, T., Behar, P.R., Medeiros, E.A., Ribeiro, J., Girão, E., Correa, L., Guerra, C., Carneiro, I., Brites, C., Reis, M., Souza, M.A., Tranchesi, R., Barata, C.U., Edmond, M.B. (2013). Nosocomial bloodstream infections in Brazilian pediatric patients: microbiology, epidemiology, and clinical features. *PLoS One*. 7, e68144.

Pereira, P. S., de Araujo, C. F., Seki, L. M., Zahner, V., Carvalho-Assef, A. P., & Asensi, M. D. (2013). Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(2), 312–316.

Peterson, C.T., Sharma, V., Elmén, L., Peterson, S.N. (2015). Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. *Clin. Exp. Immunol*. 179, 363-377.

Rabello, RF, Bonelli, RR, Penna, BA, Albuquerque, JP, Souza, RM, & Cerqueira, A. (2020). Resistência antimicrobiana em animais de fazenda no Brasil: uma visão geral da atualização. *Animals : an open access journal from MDPI*, 10 (4), 552.

Raetz, C.R., Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev. Biochem*. 71, 635-700.

Ramirez, M.S., e Tolmasky, M.E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat*. 13, 151-171.

Randall, C.P., Mariner, K.R., Chopra, I., O'Neill A.J. (2013). The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other gram-negative pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother*. 57, 637-639.

Rau, R. B., de Lima-Morales, D., Wink, P. L., Ribeiro, A. R., Martins, A. F., & Barth, A. L. (2018). Emergence of *mcr-1* Producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from Retail Meat: First Detection in Brazil. *Foodborne pathogens and disease*, 15(1), 58–59.

Rebello, A.R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J.S., Pedersen, S.K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I.M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J.A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S.A., De Frutos Escobar, C., Malhotra-Kumar, S., Villa, L., Carattoli, A., Hendriksen, R.S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveill*. 23, 17-00672.

Redgrave, L.S., Sutton, S.B., Webber, M.A., Piddock, L.J.V. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 8, 438-445.

Rodriguez-Mozaz, S., Vaz-Moreira, I., Giustina, D.V.S., Llorca, M., Barceló, D., Schubert, S., Berendonk, U.T., Michael-Kordatou, I., Fatta-Kassinos, D., Martinez, L.J., Elpers, C., Henriques, I., Jaeger, T., Schwartz, T., Paulshus, E., O'Sullivan, K., Pärnänen, M.M.K., Virta, M., Do, T.T., Walsh, F., Manaia, M.C. (2020). Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environ. Int.* vol. 140.

Rojas, L. J., Salim, M., Cober, E., Richter, S. S., Perez, F., Salata, R. A., Kalayjian, R. C., Watkins, R. R., Marshall, S., Rudin, S. D., Domitrovic, T. N., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Doi, Y., Kaye, K. S., Evans, S., Fowler, V. G., Jr, Bonomo, R. A., van Duin, D., & Antibacterial Resistance Leadership Group (2017). Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory Detection and Impact on Mortality. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 64(6), 711–718.

Rosenthal, D.V., Bijie, H., Maki, G.D., Siritt, G.E.M., Jayatilleke, K., Mehta, Y., Apisarnthanarak, A., Medeiros, A.E., Leblebicioglu, H., Fisher, D., Álvarez-Moreno, C., Khader, A.I., Martínez, G.R.D.M., Cuellar, E.L., Navoa-Ng, A.J., Abouqal, R., Garcell, G.H., Mitrev, Z., García, P.C.M., Hamdi, A., Dueñas, L., Cancel, E., Gurskis, V., Rasslan, O., Ahmed, A., Kanj, S.S., Ugalde, C.O., Mapp, T., Raka, L., Meng, Y.C., Thu, A.T.L., Ghazal, S., Gikas, A., Narváez, P.L., Mejía, N., Hadjieva, N., Elanbya, G.O.M. (2012) International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. *Am. J. Infect. Control.* 40, 396-407.

Rossi, F., Girardello, R., Cury, A. P., Di Gioia, T. S., Almeida, J. N., Jr, & Duarte, A. J. (2017). Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 21(1), 98–101.

Ruzauskas, M., e Vaskeviciute, L. (2016). Detection of the *mcr-1* gene in *Escherichia coli* prevalent in the migratory bird species *Larus argentatus*. *Antimicrob. Chemother.* 8, 2333–2334.

Sampaio, J. L., & Gales, A. C. (2016). Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on  $\beta$ -lactams and polymyxins. *Brazilian journal of microbiology : publication of the Brazilian Society for Microbiology*, 47 Suppl 1(Suppl 1), 31–37.

Schwaber, J.M., e Carmeli, Y. (2008). Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae A Potential Threat. *Jama*, 300, 2911-2913.

Sellera, S.P., Fernandes, M.R., Sartori, L., Carvalho, M.P.N., Esposito, F., Nascimento, C.L., Dutra, G.H.P., Mamizuka, E.M., Pérez-Chaparro, P.J., McCulloch, J.A., Lincopan, N. (2017). *Escherichia coli* carrying IncX4 plasmid-mediated *mcr-1* and *blaCTX-M* genes in infected migratory Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *J. Antimicrob. Chemother.* 4, 1255–1256.

Simões, A., Lima, M., Brett, A., Queiroz, C., Chaves, C., O, H., Januário, J., Rodrigues, F. (2020). Urinary Tract Infections Caused by Community-Acquired Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in a Level III Hospital - A Retrospective Study. *Acta Médica Portuguesa*. 33, 7-8.

Singh, S., Verma, N., & Taneja, N. (2019). The human gut resistome: Current concepts & future prospects. *The Indian journal of medical research*, 150(4), 345–358.

SIS (2020). Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. Disponível em: [SNIS - PAINEL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO](#). Acesso em: 02/10/2022.

Shafiq, M., Huang, J., Ur Rahman, S., Shah, J.M., Chen, L., Gao, Y., Wang, M., e Wang, L. (2019). High incidence of multidrug-resistant *Escherichia coli* coharboring *mcr-1* and *bla* recovered from pigs. *Infec. Drug Resist.* 12, 2135–2149.

Shen, Z., Wang, Y., Shen, Y., Shen, J., Wu, C. (2016). Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect. Dis.* 3, 293.

- Shinohara, S.K.N., Barros, B.V., Jimenez, C.M.S., Machado, L.C.E., Dutra, F.A.R., Filho, L.L.J. (2008). *Salmonella* spp., important pathogenic agent transmitted through foodstuffs. *Free themes*, 1675-1683.
- Spera, M.A., Esposito, S., Pagliano, P. (2019). Emerging antibiotic resistance: carbapenemase-producing Enterobacteria. *New bad bugs, still no new drugs. Le Infezioni in Medicina*, 4, 357-364.
- Stefaniuk, E.M., e Tyski, S. (2019). Colistin Resistance in Enterobacterales Strains - A Current View. *Pol. J. Microbiol.* 68, 417-427.
- Sun, P., Bi, Z., Nilsson, M., Zheng, B., Berglund, B., Lundborg, S.C., Börjesson, S., Li, X., Chen, B., Yin, H., Nilsson, L.E. (2017). Occurrence of blaKPC-2, blaCTX-M, and mcr-1 in Enterobacteriaceae from Well Water in Rural China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e02569-16.
- Tacconelli, E., Cataldo, M. A., Dancer, S. J., De Angelis, G., Falcone, M., Frank, U., Kahlmeter, G., Pan, A., Petrosillo, N., Rodríguez-Baño, J., Singh, N., Venditti, M., Yokoe, D. S., Cookson, B., & European Society of Clinical Microbiology (2014). ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20 Suppl 1, 1–55.
- Timsit, J. F., Ruppé, E., Barbier, F., Tabah, A., & Bassetti, M. (2020) Bloodstream infections in critically ill patients: an expert statement. *Intensive Care Med.* 46, 266–284.
- Tipper, D.J., e Strominger, J.L. (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 1133-1141.
- Trabulsi, A. (2015). *Microbiologia*. Alterthum, F., e Rachid, L. 6 eds (São Paulo - Editora Atheneu), pp. 407-439.
- Tran, T. B., Velkov, T., Nation, R. L., Forrest, A., Tsuji, B. T., Bergen, P. J., & Li, J. (2016) Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet?. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 48, 592–597.
- Trimble, M.J., Mlynářčík, P., Kolář, M., Hancock, R.E. (2016). Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a025288.
- Tsuji, B. T., Pogue, J. M., Zavascki, A. P., Paul, M., Daikos, G. L., Forrest, A., Giacobbe, D. R., Viscoli, C., Giamarellou, H., Karaiskos, I., Kaye, D., Mouton, J. W., Tam, V. H., Thamlikitkul, V., Wunderink, R. G., Li, J., Nation, R. L., & Kaye, K. S. (2019). International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). *Pharmacotherapy*, 39(1), 10–39.
- Tufic-Garutti, S.S., Ramalho, J.V.A., Longo, L.G.A., Oliveira, C.G., Rocha, G.T., Vilar, L.C., Costa, M.D. (2021). Acquisition of antimicrobial resistance determinants in Enterobacterales by international travelers from a large urban setting in Brazil. *Travel Medicine and Infectious Disease* 41, 102028.
- Vaara M. (2010). Polymyxins and their novel derivatives. *Current opinion in microbiology*, 13(5), 574–581.
- Van Acker, H., Coenye, T. (2016) The Role of Efflux and Physiological Adaptation in Biofilm Tolerance and Resistance. *J. Biol. Chem.* 291, 12565-12572.
- Velkov, T., Roberts, K.D., Nation, R.L., Thompson, P.E., Li, J. (2013). Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol.* 8, 711-724.
- Velkov, T., Thompson, P.E., Nation, R.L., e Li, J. (2010). Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics. *J Med Chem.* 53, 1898–1916.

- Ventola C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* 40, 277–283.
- Ventura, M. (2017). No Rio, quase 70% dos dejetos não são tratados antes de serem despejados. *O Globo*, Rio de Janeiro, 24 set. 2017. Disponível em <<https://oglobo.globo.com/economia/no-rio-quase-70-dos-dejetos-nao-sao-tratados-antes-de-serem-despejados-21865486>>. Acesso em: 23/09/2021.
- Vinué, L., Sater, M.R.A., Herriott, I.C., Huntley, M.H., Wang, M., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. (2020). Plasmids and genes contributing to high-level quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 56, 105987.
- Wachino, J.I., Doi, Y., Arakawa, Y. (2020). Aminoglycoside Resistance: Updates with a Focus on Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 4, 887-902.
- Walsh, T.R., e Wu, Y. (2016). China bans colistin as a feed additive for animals. *Lancet Infect. Dis.* 10, 1102-1103.
- Wang, D., Hu, E., Chen, J., Tao, X., Gutierrez, K., & Qi, Y. (2013). Caracterização de variantes ybjG e dacC em *Escherichia coli*. *Revista de microbiologia médica*, 62(Pt 11), 1728-1734.
- Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, Zhang S, Shen J, Shen Z, Wang Y. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg. Microbes. Infect.* 7, 122.
- Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., Zong, Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. *Emerg. Microbes. Infect.* 9, 508-516.
- Wanty, C., Anandan, A., Piek, S., Walshe, J., Ganguly, J., Carlson, R.W., Stubbs, K.A., Kahler, C.M., Vrielink, A. (2013). The Structure of the Neisserial Lipooligosaccharide Phosphoethanolamine Transferase A (LptA) Required for Resistance to Polymyxin. *J. Mol. Biol.* 18, 3389-3402.
- Wegener, C.H. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 439-445.
- Weiner-Lastinger, L.M., Abner, S., Edwards, J.R., Kallen, A.J., Karlsson, M., Magill, S.S., Pollock, D., See, I., Soe, M.M., Walters, M.S., Dudeck, M.A. (2019). Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 41, 1-18.
- Weiss, G.A., e Hennet, T. (2017). Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2959–2977.
- WHO (2017) World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Disponível em: WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Acesso em: 11/08/2021.
- WHO (2017) World Health Organization. WHO Priority Pathogens List for R&D of New Antibiotics. Disponível em: WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Acesso em: 10/08/2021.
- Wu, J., Wang, K., Wang, X., Pang, Y., Jiang, C. (2021). The role of the gut microbiome and its metabolites in metabolic diseases. *Protein Cell.* 12, 360-373.
- Xavier, B.B., Lammens, C., Ruhel, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., Malhotra-Kumar, S. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium. *Euro Surveill.* 21 pii=30280.
- Xiong, X., Bromley, E.H.C., Oelschlaeger, P., Woolfson, D.N., Spencer, J. (2011). Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a Gram-negative bacterium. *Nucleic Acids Res.* 9, 3917–3927.

- Yallew, W.W., Kumie, A., & Yehuala, F.M. (2016). Point prevalence of hospital-acquired infections in two teaching hospitals of Amhara region in Ethiopia. *Drug. Healthc. Patient Saf.* 23, 71-76.
- Yamaguchi, T., Kawahara, R., Hamamoto, K., Hirai, I., Khong, D. T., Nguyen, T. N., Tran, H. T., Motooka, D., Nakamura, S., & Yamamoto, Y. (2020). High Prevalence of Colistin-Resistant *Escherichia coli* with Chromosomally Carried *mcr-1* in Healthy Residents in Vietnam. *mSphere*, 5(2), e00117-20.
- Yang, J. Y., & Kweon, M. N. (2016) The gut microbiota: a key regulator of metabolic diseases. *BMB reports* 49, 536–541.
- Yang, Y., Song, W., Lin, H., Wang, W., Du, L., Xing, W. (2018). Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis. *Environ. Int.* 116, 60-73.
- Yang, Y.Q., Li, Y.X., Lei, C.W., Zhang, A.Y., Wang, H.N. (2018). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 1791-1795.
- Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y. (2017). Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio*. pii: e00543-17.
- Zavascki, A. P., & Nation, R. L. (2017). Nephrotoxicity of Polymyxins: Is There Any Difference between Colistimethate and Polymyxin B?. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(3), e02319-16.
- Zeng, Q., Sun, J., Zhu, L. (2019). Occurrence and distribution of antibiotics and resistance genes in greenhouse and open-field agricultural soils in China. *Chemosphere* 224, 900-909.
- Zgurskaya, H.I., López, C.A., & Gnanakaran, S. (2015). Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches To Bypass It. *ACS Infect Dis.* 1, 512–522.
- Zhang, H., Zhou, Y., Guo, S., Chang, W. (2015). High prevalence and risk factors of fecal carriage of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from healthy rural residents of Taian, China. *Front. Microbiol.* 6, 239.
- Zhang, X.F., Doi, Y., Huang, X., Li, H.Y., Zhong, L.L., Zeng, K.J., Zhang, Y.F., Patil, S., Tian, G.B. (2016). Possible Transmission of *mcr-1*-Harboring *Escherichia coli* between Companion Animals and Human. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1679-1681.
- Zhao, M., Bulman, Z. P., Lenhard, J. R., Satlin, M. J., Kreiswirth, B. N., Walsh, T. J., Marrocco, A., Bergen, P. J., Nation, R. L., Li, J., Zhang, J., & Tsuji, B. T. (2017). Pharmacodynamics of colistin and fosfomycin: a 'treasure trove' combination combats KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 72(7), 1985–1990.
- Zing, W., Hopkins, S., Gayet-Ageron, A., Holmes, A., Sharland, M., Suetens, C. (2017). Health-care-associated infections in neonates, children, and adolescents: an analysis of paediatric data from the European Centre for Disease Prevention and Control point-prevalence survey. *Lancet. Infect. Dis.* 4, 381-389.
- Zinsstag, J., Meisser, A., Schelling, E., Bonfoh, B., Tanner, M. (2012). From 'two medicines' to 'One Health' and beyond. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 79, a492.
- Zurfuh, K., Poirel, L., Nordmann, P., Nüesch-Inderbinnen, M., Hächler, H., Stephan, R. (2016). Occurrence of the Plasmid-Borne *mcr-1* Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 2594-2595.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo 1

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PROJETO INTITULADO

Fontes atribuíveis à colonização intestinal comunitária por bacilos gram-negativos resistentes aos antimicrobianos.

#### TERMO DE ESCLARECIMENTO

1). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) será obtido previamente à coleta dos swabs. Os voluntários serão esclarecidos quanto aos detalhes do projeto, tais como, objetivo e importância do estudo.

2). Este projeto tem como objetivos, (i) Descrever a prevalência de colonização comunitária do trato gastrointestinal (TGI) por bacilos gram-negativos resistentes aos antimicrobianos (BGN-RA) de importante uso na prática médica humana (ii) estudar os fatores que possam ter influência sobre tal colonização, através da análise de informações acerca do estilo de vida e dados sócio-econômicos, cedidas por meio de questionário.

3). Para avaliação da colonização intestinal, que é o foco do estudo, é necessária a pesquisa dessas bactérias em fezes humanas. Os swabs serão coletados pelo próprio indivíduo, acondicionados em tubo com meio de transporte, enviadas ao Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e mantidas refrigeradas até o processamento.

4). As amostras serão processadas no LIMM e terão como finalidade, exclusivamente, a aplicação nesse projeto de pesquisa.

5). O estudo não oferecerá risco ou desconforto aos voluntários doadores, visto que as amostras serão coletadas pelos próprios pacientes ou por intermédio de um familiar acompanhante.

6). Os resultados deste trabalho poderão determinar as possíveis situações que proporcionam à colonização intestinal por BGN-RA em indivíduos na comunidade. Com estes achados será possível direcionar estratégias de prevenção à exposição, contribuindo com medidas de controle da disseminação da resistência aos antimicrobianos na comunidade.

## **GARANTIA DE ACESSO**

**1).** Em qualquer etapa do estudo você terá acesso ao pesquisador responsável (Dra. Marcia Garnica), o qual poderá ser encontrado através dos telefones: ((21) 2729-1551 ou (21) 98109-9626 ou pelo e-mail [marciagarnica@hucff.ufrj.br](mailto:marciagarnica@hucff.ufrj.br). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Peixoto Gomide, 527, Cerqueira Cesar, São Paulo – SP – CEP 01409-001; tel: (11) 3147-9645, e-mail: [cep9j@h9j.com.br](mailto:cep9j@h9j.com.br).

**2).** Você terá liberdade de não participar ou retirar seu consentimento a qualquer momento, no caso de aceitação, e deixar de participar do estudo.

**3).** A privacidade do voluntário será respeitada, de forma que ele tem direito de limitar a exposição de seu corpo, sua imagem, dados, julgamentos expressos em questionários, entre outros. O pesquisador firma um compromisso de que somente utilizará o material coletado para esta pesquisa.

**4).** Os resultados dos procedimentos, bem como dados do voluntário, somente serão de competência dos pesquisadores envolvidos no projeto, não sendo permitido o acesso a terceiros (seguidores, empregadores, superiores hierárquicos, entre outros).

**5).** Você tem direito a ser mantido atualizado acerca dos resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

**6).** As amostras de bactérias encontradas nas fezes serão estocadas, para manter sua viabilidade até que o estudo seja finalizado. Posteriormente, estas amostras serão devidamente descartadas.

**7).** O pesquisador se compromete a utilizar os dados e material coletados somente para a finalidade desta pesquisa científica.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
(MICROBIOLOGIA)

**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Eu, \_\_\_\_\_,  
acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo  
**“Fontes atribuíveis à colonização intestinal comunitária por bacilos gram-negativos  
resistentes aos antimicrobianos.”**, por meio  
de \_\_\_\_\_ (pesquisador responsável). Ficaram  
claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, a  
ausência de desconfortos e riscos, e as garantias de confidencialidade e de atualizações ao  
longo do estudo. Estou ciente de que minha participação é isenta de despesas ou  
beneficiamento financeiros e que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento,  
sem penalidades ou prejuízos. Desta forma, concordo voluntariamente em participar deste  
estudo. Uma via desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) estará sob minha  
posse, e uma outra sob posse do pesquisador responsável pela pesquisa, sendo do meu  
consentimento rubricar todas as páginas desse TCLE e assinar a última, juntamente com o  
pesquisador responsável.

\_\_\_\_\_  
Voluntário

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

9.2. Anexo 2

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação de uma mudança de paradigma quanto à origem da aquisição de bacilos gram-negativos resistentes aos antimicrobianos: do hospital para a comunidade

**Pesquisador:** Marcia Garnica

### Área Temática:

**Versão:** 1

**CAAE:** 46762621.2.0000.5455

**Instituição Proponente:** IMPAR SERVICOS HOSPITALARES S/A

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.812.469

### Apresentação do Projeto:

As infecções causadas por BGN MDR (bacilos gram-negativos multidrug resistant) constitui um problema mundial de saúde pública, em que as opções terapêuticas são limitadas ou mesmo inexistentes. A ocorrência delas é maior nos países em desenvolvimento, ocasionando elevada morbidade, mortalidade, impacto econômico e social. Apesar destas bactérias causarem

**Endereço:** Rua Peixoto Gomide, 285 - 1º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**CEP:** 01.409-001

**Telefone:** (11)3147-9645

**E-mail:** cep9j@h9j.com.br

Continuação do Parecer: 4.812.469

mais infecções em ambientes hospitalares, no Brasil, a contaminação de alimentos e águas recreativas com BGN-RAs já foi descrita, assim como em outros países. Todavia, o papel destes reservatórios de microrganismos multirresistentes na ocorrência das infecções nos pacientes submetidos aos cuidados em saúde não é conhecido. A extensa disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos em diversos ambientes naturais nos sugere uma possível relação entre a exposição e colonização. Entretanto, são poucos os estudos que avaliaram a colonização de indivíduos da comunidade por estes microrganismos, sobretudo no Brasil. Ademais, dentre os estudos que fizeram esta pesquisa, poucos exploraram o papel dos hábitos alimentares, recreativos, socioeconômicos e de estilo de vida nesta ocorrência. A hipótese deste estudo é a de que o ambiente contaminado com estes microrganismos promove a colonização de seres humano que, por sua vez, podem servir como reservatório e veículo destes microrganismos para as instituições de saúde. Portanto, o objetivo do trabalho é determinar a prevalência e a origem da colonização comunitária do TGI por BGN MDR, bem como possíveis fatores de risco associados a esta ocorrência, em pacientes atendidos em uma unidade de pronto atendimento. Para tal, serão coletados espécimes clínicos (fezes ou swabs retais) de 2400 indivíduos, sem histórico de internação recente em instituições de saúde, para a investigação de colonização por BGNs produtores de cefalosporinases do tipo AmpC, ESBL, carbapenemases e com resistência transferível à colistina. Um questionário acerca de hábitos

e estilo de vida, bem como dados socioeconômicos será aplicado. Serão recrutados os pacientes atendidos na unidade de pronto atendimento do Complexo Hospitalar de Niterói ao longo de 12 meses, sem restrição de idade, que não possuam hospitalização recente (6 meses antes da coleta do espécime) ou qualquer outra espécie de cuidado médico prolongado, e que atestem participação voluntária no estudo por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os participantes serão convidados a responder um questionário e a fornecer um swab retal. As amostras serão processadas para a identificação e caracterização de susceptibilidade antimicrobiana sob pressão seletiva, incluindo a caracterização quanto ao perfil fenotípico e genotípico de resistência. Os resultados da caracterização fenotípica e genotípica e do questionário serão confrontados com os dados obtidos de estudos complementares para a avaliação de potenciais fontes ambientais para a colonização.

## Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

**Endereço:** Rua Peixoto Gomide, 285 - 1º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**CEP:** 01.409-001

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3147-9645

**E-mail:** ceph9j@h9j.com.br

HOSPITAL  
NOVE  
DE JULHO

- Determinar a prevalência e a origem da colonização comunitária do TGI por BGN MDR



**Endereço:** Rua Peixoto Gomide, 285 - 1º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**CEP:** 01.409-001

**Telefone:** (11)3147-9645

**E-mail:** cep9j@h9j.com.br

Continuação do Parecer: 4.812.469

#### Objetivo Secundário:

Objetivos específicos:– Descrever a prevalência de colonização comunitária do TGI por BGN MDR.– Analisar as variáveis epidemiológicas e clínicas potencialmente associadas à aquisição da colonização comunitária do TGI por BGN MDR;– Identificar os determinantes genéticos envolvidos nos fenótipos de resistência observados;– Identificar as linhagens de BGN MDR mais frequentes na colonizaçãocomunitária do TGI;

## Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não estão previstos riscos para os indivíduos incluídos neste projeto. Trata-se de um estudo observacional com coleta de dados mediante entrevista, que não trará qualquer risco aos indivíduos nele incluídos. Não haverá nenhuma interferência da equipe participante do projeto na assistência dos pacientes. O único exame adicional àqueles já indicados pela equipe assistencial será coleta de swab retal para cultura; exame não invasivo que não causa risco ou incômodo adicional aos pacientes. As análises microbiológicas adicionais das amostras bacterianas oriundas dos swabs serão realizadas em colaboração com laboratório de pesquisa de referência para estudo de microrganismos multirresistentes (LIMM, IMPG, UFRJ) sob a responsabilidade da Profª Drª Renata C. Picão. Não serão armazenados espécimes clínicos dos pacientes incluídos no projeto. A coleta e manuseio dos dados serão realizados somente pelos pesquisadores incluídos no projeto. Será garantido sigilo que assegure a privacidade dos sujeitos e a confidencialidade dos dados dos indivíduos incluídos no estudo. Os resultados serão divulgados de forma compilada em meios tradicionais de divulgação científica como congressos e revistas científicas. Os dados obtidos não serão usados para outros fins não previstos neste protocolo.

#### Benefícios:

Esperamos, ao longo do desenvolvimento deste projeto, gerar informações sobre a colonização de indivíduos da comunidade por BGN MDR, principais causadores de infecções oportunistas. Esse conhecimento poderá orientar rotinas de prevenção e terapêuticas para este agravo nessa população. Consequentemente, contribuir para a melhoria da assistência prestada. Contudo, as informações geradas poderão não beneficiar diretamente o paciente incluído na pesquisa.

## Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo prospectivo para avaliar colonização por bacilos gram negativos multirresistentes a antimicrobianos em pacientes atendidos em unidade de pronto atendimento.

**Endereço:** Rua Peixoto Gomide, 285 - 1º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**CEP:** 01.409-001

**Telefone:** (11)3147-9645

**E-mail:** ceph9j@h9j.com.br

## Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE e termos de confidenciabilidade adequados

## Recomendações:

Incluir no projeto de pesquisa o questionário que será aplicado aos pacientes e cuja informação consta do TCLE

## Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

## Considerações Finais a critério do CEP:

A atualização dos Protocolos de Pesquisa é procedimento obrigatório conforme as Resoluções 466/2012 e 510/16 (a cada seis meses), bem como enviar relatório final, quando do término do estudo (através de “Notificação” via Plataforma Brasil).

## Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO PROJETO_1697239.pdf	12/05/2021 07:33:42		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeconsentimentonovoendereço.docx	12/05/2021 07:33:30	Marcia Garnica	Aceito
Folha de Rosto	folharostoassinada.pdf	07/05/2021 15:23:33	Marcia Garnica	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoinstituicaoCHN1.pdf	07/05/2021 15:23:10	Marcia Garnica	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCompletoCEP_semseguimento.docx	04/05/2021 08:54:55	Marcia Garnica	Aceito

**Endereço:** Rua Peixoto Gomide, 285 - 1º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**CEP:** 01.409-001

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3147-9645

**E-mail:** cep9j@h9j.com.br

Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaodeinstituicaoCCS.pdf	04/05/2021 08:47:29	Marcia Garnica	Aceito
Orçamento	orcamento_reduzido.docx	04/05/2021 08:47:12	Marcia Garnica	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	cartaapresentacaoprojeto1.pdf	02/05/2021 17:46:55	Marcia Garnica	Aceito
Outros	curriculumpesquisadores.docx	02/05/2021 17:37:20	Marcia Garnica	Aceito
Outros	termodeconfidencialidade.docx	02/05/2021 17:32:07	Marcia Garnica	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	02/05/2021 17:30:15	Marcia Garnica	Aceito

## Situação do Parecer:

Aprovado

## Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 28 de Junho de 2021

---

Assinado por:

**Antonio Carlos Campos Pignatari(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Peixoto Gomide, 285 - 1º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**CEP:** 01.409-001

**Telefone:** (11)3147-9645

**E-mail:** cep9j@h9j.com.br