

**Carla Adriana dos Santos**

**Caracterização fenotípica e molecular de isolados de  
*Salmonella* spp. e *Escherichia coli* Patogênica  
Extraintestinal resistentes às polimixinas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração:** Vigilância em Saúde Pública

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Monique Ribeiro Tiba Casas

**São Paulo**

**2023**

**Carla Adriana dos Santos**

**Caracterização fenotípica e molecular de isolados de  
*Salmonella* spp. e *Escherichia coli* Patogênica  
Extraintestinal resistentes às polimixinas**

**Área de Concentração:** Vigilância em Saúde Pública

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Monique Ribeiro Tiba Casas

**São Paulo**

**2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Santos, Carla Adriana dos

Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* patogênica extraintestinal resistentes às polimixinas/Carla Adriana dos Santos. - 2022.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Vigilância em Saúde Pública

Orientação: Profa. Dra. Monique Ribeiro Tiba Casas

1. Infecções por salmonella/epidemiologia. 2. Infecções por *Escherichia coli*/epidemiologia. 3. Resistência a múltiplos medicamentos/genética. 4. Colistina/uso terapêutico. 5. Polimixina B/uso terapêutico. 6. Epidemiologia molecular/estatística & dados numéricos.

SES/CCD/CD - 455/2022

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, minha família, meu namorado Carlos Almeida e minha orientadora que me ajudaram dando força, apoio e coragem para concluir meus objetivos.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me guiar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Agradeço aos meus pais Eliane Rosa e Eliezer Arlindo, minha irmã Izadora Correia e minha tia Selma Correia por me apoiarem sempre e terem ficado do meu lado em todas minhas escolhas. A todos os meus familiares e amigos por terem feito parte desta história e também sempre me apoiarem em todos os momentos.

Agradeço ao meu namorado Carlos Almeida e seus pais Dona Cleide e Senhor Armando por me ajudarem e me dar apoio em todos os momentos, sempre que precisei em minhas maiores dificuldades vocês estava me apoiando e me dando forças para seguir em frente.

Agradeço a minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Monique Tiba Casas, que apesar de toda a dificuldade sempre foi disposta a me ajudar e tirar minhas dúvidas, me ajudou quando precisei e foi muito compreensiva quando optei por conciliar o mestrado com o trabalho.

Agradeço às minhas colegas de quarto Michellin Albuquerque e Sâmela Klein, pelas meninas que tive a oportunidade de conhecer no IAL, Amanda Bertani, Carolina Pedace e Mariana Bueno por me ajudarem em momentos de apertos e pela companhia em muitos momentos marcantes e felizes.

Agradeço a todos os funcionários do setor de bacteriologia no Instituto Adolfo Lutz, pelo conhecimento que me proporcionou não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram, não somente por terem ensinado, mas por terem me feito aprender cada dia mais, em especial ao Prof. Dr. Carlos Camargo e Sonia Regina.

E por fim, não menos importante, agradeço e dedico também em memória de meus tios Fábio Rosa, Jonas Arlindo e Dinaldo Fernandes, meus avôs Wital Correia e Zeli Dias que sempre torceram pela conclusão do meu mestrado e sempre me apoiaram.

Agradeço ao Instituto Adolfo Lutz e a Coordenadoria de Controle de da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo CCD – SES – SP, pela oportunidade que proporcionaram tanto a mim, quanta a diversos outros profissionais. Pelos professores que tive contato no programa de pós-graduação ao compartilharem seu valioso conhecimento e aos alunos da minha turma quem tive a oportunidade de conhecer e realizar trabalhos em grupo.

## RESUMO

A resistência antimicrobiana está se tornando um grande desafio para saúde pública devido ao aumento da resistência aos beta-lactâmicos em geral. Os isolados de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* são os mais frequentes agentes causadores de doenças de transmissão hídrica e alimentar, mas também podem causar doenças invasivas graves, principalmente em imunodeprimidos, idosos e crianças. Ambos os patógenos vêm apresentando perfis de resistência as principais classes de antibióticos, nestes casos é necessária a busca de uma nova opção terapêutica, como por exemplo, as polimixinas. Em 2015, surgiu o primeiro relato da resistência às polimixinas mediado pelo gene *mcr* (*mobile colistin resistance*), que se disseminou por diversos continentes e ocasionou uma grande preocupação global em saúde pública. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar os mecanismos que medeiam à resistência à polimixinas em cepas de *Salmonella* spp. e *E. coli* Patogênica extraintestinal (ExPEC). Foi realizado a triagem pelo teste da gota e teste da CIM frente a colistina e polimixina B no total de 1026 isolados de *Salmonella enterica* e 159 isolados de ExPEC. Nos isolados resistentes foi verificado a presença de mutações nos genes (*pmrA/B*, *phoP/Q*) associados à resistência às polimixinas, e através da PCR foi feita a identificação dos genes de resistência plasmidial (*mcr*). Das 124 cepas de *Salmonella* resistentes a colistina e polimixina B, apenas um isolado foi positivo para o gene *mcr-1*, e este gene foi detectado em um plasmídeo do grupo *IncX4*. A cepa 2018.466 foi caracterizada como *S. Choleraesuis* proveniente de sangue de origem humana. Foram identificados 44 isolados de *Salmonella* spp. apresentando mutações em *pmrA* e *pmrB*. Dos 56 isolados de ExPEC resistentes a colistina, 21 isolados apresentaram o gene *mcr-1*. Este gene foi detectado em plasmídeos do grupo *IncX4* (n=17) e em plasmídeos do grupo *IncF* (n=4). Cinco isolados de *E.coli* não apresentaram mutações nos genes estudados, sendo que três eram positivos para o gene *mcr-1*, enquanto as demais cepas apresentaram mutações em *pmrA/B* e *phoP/Q*. A tipagem pela PFGE foi realizada nos isolados de *E.coli* positivos para o gene *mcr-1*, com o objetivo de verificar a diversidade genética encontrada entre elas. Foram identificados 18 perfis genéticos, sem um clone principal, com porcentagem de similaridade de 54,5% entre os isolados. Com a realização do presente trabalho foi possível constatar que alguns sorovares de *Salmonella* podem ser intrinsecamente resistentes a esses fármacos. Além disso, verificamos que o gene *mcr-1* são albergados em plasmídeos epidêmicos. Este estudo confirma a necessidade de monitorar e pesquisar os mecanismos que conferem resistência a colistina, para permitir estratégias eficazes para preservar a eficácia dos antibióticos no futuro, e que devemos implementar ações de prevenção da disseminação da resistência ao nível da medicina humana, da medicina veterinária e do meio ambiente.

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance is becoming a major public health challenge due to increasing resistance to beta-lactams in general. *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* are the most frequent causative agents of water and foodborne diseases, but they can also cause serious invasive diseases, especially in immunocompromised, elderly and children. Both pathogens have shown resistance profiles to the main classes of antibiotics, in these cases it is necessary to search for a new therapeutic option, such as polymyxins. In 2015, the first report of resistance to polymyxins mediated by the *mcr* (mobile colistin resistance) gene appeared, which has spread across several continents and caused great global public health concern. The objective of this work was to identify and characterize the mechanisms that mediate resistance to polymyxins in strains of *Salmonella* spp. and Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC). Screening was performed by the drop test and CIMtest against colistin and polymyxin B in a total of 1026 isolates of *Salmonella enterica* and 159 isolates of ExPEC. In resistant isolates, the presence of mutations in genes (*pmrA/B*, *phoP/Q*) associated with resistance to polymyxins was verified, and through PCR the identification of plasmid resistance genes (*mcr*) was carried out. Of the 124 *Salmonella* strains resistant to colistin and polymyxin B, only one isolate was positive for the *mcr-1* gene, and this gene was detected in a plasmid of the *IncX4* group. Strain 2018,466 was characterized as *S. Choleraesuis* from human blood. We identified 44 isolates of *Salmonella* spp. showing mutations in *pmrA* and *pmrB*. Of the 56 colistin-resistant ExPEC isolates, 21 isolates had the *mcr-1* gene. This gene was detected in plasmids from the *IncX4* group (n=17) and in plasmids from the *IncF* group (n=4). Five *E. coli* isolates showed no mutations in the genes studied, three of which were positive for the *mcr-1* gene, while the other strains showed mutations in *pmrA/B* and *phoP/Q*. PFGE typing was performed on *E. coli* isolates positive for the *mcr-1* gene, in order to verify the genetic diversity found among them. Eighteen genetic profiles were identified, without a main clone, with a percentage of similarity of 54.5% between the isolates. With the accomplishment of the present work, it was possible to verify that some *Salmonella* serovars may be intrinsically resistant to these drugs. Furthermore, we found that the *mcr-1* gene is harbored in epideCIMplasmids. This study confirms the need to monitor and research the mechanisms that confer resistance to colistin, to allow effective strategies to preserve the effectiveness of antibiotics in the future, and that we must implement actions to prevent the spread of resistance at the level of human medicine, veterinary medicine and the environment.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ANLIS Malbran:** Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud Dr. Carlos G. Malbrán

**ATCC:** American Type Culture Collection

**BrCAST:** Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**CAMPs:** Adenosina 3,5-monofosfato cíclico

**CBDE:** Eluição de discos de colistina em caldo

**CDC:** Center for Disease Control and Prevention

**CIM:** Concentração Inibitória mínima

**CIM<sub>50</sub>:** Concentração inibitória mínima 50

**CIM<sub>90</sub>:** Concentração inibitória mínima 90

**CLSI:** Clinical & Laboratory Standards Institute

**DAEC:** *E. coli* de adesão difusa

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DTA:** Doenças transmitidas por alimentos

**EAEC:** *E. coli* enteroagregativa

**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético

**EHEC:** *E. coli* enterohemorrágica

**EIEC:** *E. coli* enteroinvasiva

**EPEC:** *E. coli* enteropatogênica

**ESBLs:** β-lactamases de espectro estendido

**ETEC:** *E. coli* enterotoxigênica

**EUA:** Estados Unidos da América

**EUCAST:** The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**ExPEC:** *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

**H<sub>2</sub>S:** Sulfeto de hidrogênio

**ITU:** Infecções no trato urinário

**LPS:** Lipolissacarídeo

**MDR:** Resistência a múltiplos fármacos

**NTS:** *S. enterica* não-tifoidal

**NTSi:** *S. enterica* não-tifoidal invasiva

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**OPAS:** Organização Pan-americana da Saúde

**PAP:** Perfil de análise populacional

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**PEA:** Fosfoetanolamina

**PFGE:** Pulsed-field Gel Electrophoresis

**STEC:** *E. coli* produtora de toxina Shiga

**TBE:** Tris/Borate/EDTA

**TC:** Sistema de dois componentes

**TSA:** Tryptic soy agar

**UPGMA:** Unweighted Pair Group using Mathematical Average Taxonomy

**XDR:** Extensivamente resistente

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Disseminação gene <i>mcr</i> ( <i>mobile colistin resistance</i> ) no mundo... 13	13
<b>Figura 2:</b> Relatos da circulação de <i>mcr</i> entre o ano de 2016 e 2022 em <i>Salmonella</i> spp de diversas origens e ExPEC no Brasil. .... 16	16
<b>Figura 3:</b> A estrutura geral do peptídeo catiônico cíclico (A) polimixina E (colistina) e (B) polimixina B. .... 21	21
<b>Figura 4:</b> Regulação de PmrAB e phoPQ na resistência às polimixinas. .... 25	25
<b>Figura 5:</b> Metodologia de teste da gota aplicado em um isolado de <i>Salmonella</i> spp..... 32	32
<b>Figura 6:</b> Dendrograma obtido pela análise por PFGE dos fragmentos obtidos pela digestão com XbaI das cepas de <i>E.coli</i> positivas para o gene <i>mcr-1</i> . Foi utilizado o coeficiente de Dice com tolerância e otimização de 1,5% e UPGMA (Bionumerics 8.0). Estão indicados: número da amostra_ano (key), tipo de <i>Inc type</i> plasmidial, e sítio de origem (source). .... 62	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequência de oligonucleotídios para os genes mcr. ....	34
<b>Tabela 2:</b> Sequência de oligonucleotídios para detecção de resistência cromossomal a colistina.....	35
<b>Tabela 3:</b> Iniciadores utilizados na técnica de PCR para a tipagem dos replicons plasmidiais.....	40
<b>Tabela 4:</b> Resultados da prevalência de sorotipos de Salmonella spp. por ano (2016-2018).....	44
<b>Tabela 5:</b> Resultados do teste de suscetibilidade à colistina e polimixina B através do teste da gota entre os sorovares de Salmonella spp. isolados nos anos de 2016-2018. ....	48
<b>Tabela 6:</b> Distribuição detalhada de CIM obtida por sorotipo (2016-2018) ..	52
<b>Tabela 7:</b> Resultado das mutações encontradas em isolados de Salmonella. ....	55
<b>Tabela 8:</b> Descrição das mutações dos genes pmrA/B e phoP/Q em E. coli. ....	59

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Distribuição geográfica de isolados de <i>Salmonella</i> spp. nos anos de 2016-2018.....	43
<b>Gráfico 2:</b> Distribuição geográfica dos isolados de <i>E. coli</i> nos anos de 2016-2020. ....	44
<b>Gráfico 3:</b> Distribuição da origem dos isolados de <i>Salmonella</i> spp. nos anos de 2016 a 2018. ....	47
<b>Gráfico 4:</b> <i>Origem dos isolados de E. coli nos anos de 2016-2020.</i> .....	47
<b>Gráfico 5:</b> Resultados do teste de suscetibilidade à colistina e polimixina B através do teste da gota entre isolados de <i>E. coli</i> nos anos de 2016-2020..	51
<b>Gráfico 6:</b> Resultados da CIM* da colistina por sorotipo em <i>Salmonella</i> resistentes para colistina e polimixina B.....	52

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. Características gerais do gênero <i>Salmonella</i> .....	18
2.2. Características gerais da espécie <i>Escherichia coli</i> .....	18
2.3. Mecanismos de resistência às polimixinas .....	19
2.3.1. Características gerais das polimixinas .....	19
2.3.2. Resistência intrínseca.....	22
2.3.3. Resistência à colistina mediada por cromossomos.....	23
2.3.4. Mecanismos de resistência adquiridos em bactérias Gram-negativa .....	25
2.3.5. Resistência à colistina mediada por plasmídeo .....	25
3. OBJETIVOS .....	28
3. OBJETIVOS .....	29
3.1. Objetivo geral.....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. Amostras bacterianas .....	31
4.2. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	31
4.2.1. Teste da Gota .....	31
4.2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima .....	32
4.3. Caracterização dos genes de resistência antimicrobiana.....	33
4.3.1. Extração do DNA bacteriano .....	33
4.3.2. Detecção dos genes de resistência antimicrobiana a colistina ( <i>mcr</i> ) por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	33
4.3.3. Eletroforese em gel de agarose.....	34
4.3.4. Detecção e caracterização de mutações nos genes <i>pmrA/B</i> e <i>phoP/Q</i> .....	35
4.3.5. Sequenciamento pelo método de Sanger .....	36
4.4. Técnica de PFGE .....	37
4.5. Tipagem dos grupos de incompatibilidade ( <i>Inc Type</i> ) plasmidial ....	39

5. RESULTADOS .....	43
5.1. Dados epidemiológicos das amostras estudadas .....	43
5.2. Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana.....	48
5.2.1. Triagem pelo teste da Gota em <i>Salmonella</i> .....	48
5.2.2. Triagem pelo teste da Gota em <i>E. coli</i> .....	50
5.2.3- Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	51
5.3. Caracterização Genotípica dos mecanismos de resistência a polimixinas.....	53
5.3.1. Caracterização do gene de resistência antimicrobiana a colistina ( <i>mcr</i> ). .....	54
5.3.2. Detecção e caracterização dos genes <i>pmrA/B</i> e <i>phoP/Q</i> em <i>Salmonella</i> .....	54
5.3.3. Detecção e caracterização dos genes <i>pmrA/B</i> e <i>phoP/Q</i> em <i>E. coli</i> . .....	58
5.4. Resultado da Técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) ..	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75

## **1.INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

*Salmonella* spp. e *Escherichia coli* são importantes enteropatógenos que ocasionam surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ao redor do mundo. É estimado que *Salmonella* não tifóide seja responsável por cerca de 93,8 milhões de casos e 155.000 mortes a cada ano em todo o mundo (Majowicz *et al.*, 2010). Nos EUA, são estimados pelo CDC (*Centers for Diseases Control and Prevention*), mais de um milhão de casos anuais de salmonelose, que estão associados ao maior número de hospitalizações e mortes em comparação com outros agentes microbianos de origem alimentar (Scallan *et al.*, 2011). Este patógeno é tipicamente encontrado em aves e este tipo de carne tem sido um importante veículo de surtos alimentares. De fato, no Brasil, a carne de frango é amplamente consumida, representando um risco potencial para a saúde pública (Antunes *et al.*, 2016).

*Escherichia coli*, por sua vez, permanece no intestino delgado de seres vivos de sangue quente, sendo na grande maioria bactérias comensais, porém, alguns patótipos podem ocasionar surtos alimentares (diarreias e gastroenterites) e infecções extra-intestinais (WHO, 2021a,b). Bonten *et al.* (2021), verificou que a taxa de incidência geral de bacteremia ocasionada por *E. coli* foi de 48 casos por 100.000 pessoas/ano, aumentando de acordo com a idade. A Infecção no Trato Urinário (ITU) é a principal fonte de bacteremia ocasionada por *E. coli*, sendo responsável por mais de 50% dos casos avaliados no Brasil. *E. coli* é o sexto patógeno frequentemente isolado em bacteremias hospitalares (596 isolados resistentes) e ITU (2639 isolados resistentes) em unidades de terapia intensiva (UTI) adulto no Brasil (Anvisa, 2019). Mundialmente ocorrem 130 a 175 milhões de casos de ITU não complicadas, e mais de 80% dos casos estão relacionados a *E. coli* que causam 40.000 mortes por sepse a cada ano nos Estados Unidos (Anvisa, 2019; Vincent *et al.*, 2010).

As infecções invasivas por *Salmonella* spp. e *E. coli* costumam ser tratadas com antibióticos de amplo espectro, recomendados pelo “*Infectious Diseases Society of America Clinical*”, entre eles, podemos citar as

cefalosporinas e quinolonas (Shane *et al.*, 2017). Entretanto, nos últimos anos, houve um aumento da frequência da resistência a estes antimicrobianos que vem se desenvolvendo e se disseminando por diversos microorganismos, tornando-se um grande problema de saúde pública. Já foram publicados diversos relatos de salmonelas multirresistentes (MDR), assim como *E. coli* MDR (Bartoloni *et al.*, 2013; Biedenbach *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2017; Tiba-Casas *et al.*, 2019). Cerca de 700.000 pessoas morrem a cada ano por infecções de cepas resistentes ao tratamento, e se não for tomada nenhuma precaução efetiva, até o ano de 2050, estima-se que possa chegar a 10 milhões de mortes por ano, com um custo de 100 trilhões de dólares para a economia global (O'NEILL, 2016).

Em países desenvolvidos, essa resistência pode ser relacionada com as doses terapêuticas e subterapêuticas de antibióticos em animais de corte e aditivos nas rações para promoção de seu crescimento. Nos países em desenvolvimento, relaciona-se ao uso indiscriminado de antibióticos na população (comunidade e em hospitais). Em animais, apesar dos esforços para minimizar o uso inadequado, ainda há a incorporação deles ou de produtos contendo moléculas presentes em antimicrobianos na nutrição animal visando melhorar o desempenho e aumentar a produtividade, ou para evitar problemas nas primeiras semanas de vida. Por se tratar de uma zoonose, a *Salmonella* spp. permite e propicia a circulação destes perfis de resistência entre humanos e animais (Poirel, Jayol e Nordmanna, 2017; Sun *et al.*, 2018). Atualmente, o uso indiscriminado de antibióticos durante a pandemia de COVID-19 como profilaxia ou até mesmo tratamento, ocasionou o aumento de notificações nas Américas e surtos de infecções resistentes a medicamentos (OPAS, 2022).

A proliferação de  *$\beta$ -lactamases de espectro estendido* (ESBLs) trouxe como opção terapêutica os carbapenêmicos, entretanto, houveram adaptações evolutivas sob a pressão de seleção dos carbapenêmicos, e as bactérias Gram-negativas adquiriram formas de evadir os efeitos do antimicrobiano em questão, o que resultou também em sua ineficácia em

muitos tratamentos. Essa resistência se disseminou em todo mundo rapidamente e então houve a necessidade de recorrer a outros antibióticos com sucesso terapêutico contra bactérias Gram-negativas MDR (Falagas; Kasiakou e Saravolatz, 2005; Sekyere, *et al.* 2016; Shankar, 2016).

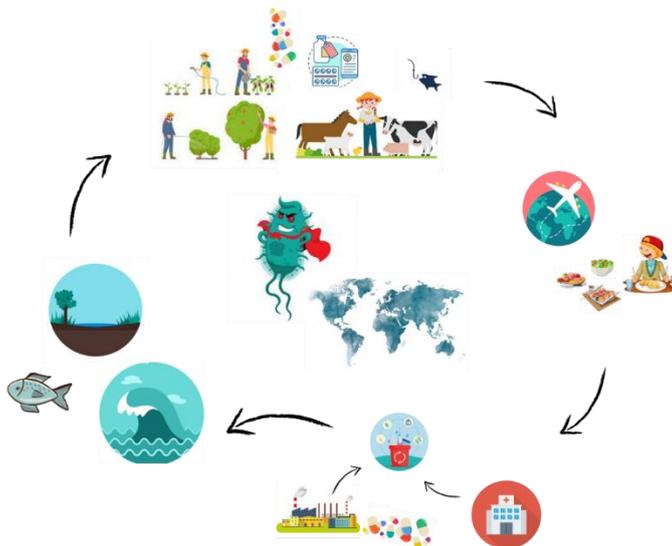
Quando a colistina foi reintroduzida em ambientes clínicos há mais de duas décadas para combater bactérias Gram-negativas multirresistentes (MDR), ela se tornou um ponto de apoio criado para o tratamento destas infecções. No entanto, apesar de sua eficácia, a neurotoxicidade e nefrotoxicidade da colistina restringiram seu uso em humanos ao tratamento de infecções por bactérias MDR clinicamente relevantes, particularmente aquelas causadas por Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos (Catry *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2006). Em contraste, a colistina tem sido usada extensivamente por décadas na criação de animais, não apenas para a prevenção e terapia de doenças infecciosas, mas também para a promoção do crescimento (Catry *et al.*, 2015; Kempf *et al.*, 2016). Apesar das enormes quantidades de colistina usadas na criação de animais para corteolai, os níveis de resistência à colistina entre Enterobacteriaceae de animais permaneceram baixos até bem recentemente (Kempf *et al.*, 2016; Olaitan *et al.*, 2014).

Colistina tem sido utilizada na medicina veterinária por décadas e ainda é administrada mundialmente, sendo utilizada como promotor de crescimento em certos países como China, Índia, Japão e Vietnã. A colistina pode ser administrada sozinha ou em combinação oral, tópica ou injetável, sendo utilizada para tratar todas as espécies de animais aquáticos e terrestres (Kempf *et al.*, 2016). Na produção de suínos, o uso está, portanto, relacionado principalmente ao tratamento de distúrbios digestivos, como observado em todas as espécies na Europa, onde as polimixinas representaram 30% das respostas à diarreia (Kempf *et al.*, 2016).

A colistina é comumente usada como um sulfato que é administrado por via oral na alimentação de porcos, galinhas e - em menor extensão - gado. Nesta forma, a colistina estimula significativamente o crescimento de animais

jovens, aumenta a conversão alimentar e aumenta o retorno econômico para o agricultor. Além da administração oral, a colistina injetável desempenha um papel importante no tratamento de doenças causadas por bactérias Gram-negativas em suínos e bovinos, sendo responsável por 13,6% das vendas globais de polimixina (colistina oral constitui o restante) (Shen *et al.*, 2020). As indústrias de criação de frangos e suínos são responsáveis por mais de 96% do uso total de sulfato de colistina ao redor do mundo. Portanto, a pressão de seleção imposta pelo uso de colistina é provavelmente enorme na pecuária, o que pode ter contribuído para o surgimento e rápida disseminação do gene de resistência móvel *mcr-1* em bactérias de origem animal (Shen *et al.*, 2020).

A disseminação global da resistência tem sido associada ao aumento do consumo de frutos do mar, alimentos crus ou malcozido de origem animal e viagens. O uso de antimicrobianos em animais domésticos, plantas e frutas como profilaxia e principalmente a eliminação residual da produção de colistina em indústria farmacêuticas, hospitais em fontes de água (Figura 1) também é um fator para aquisição do patógeno com resistência (Daza-Cardona *et al.*, 2022).



Fonte: própria.

Figura 1: Disseminação gene *mcr* (mobile colistin resistance) no mundo.

Em face da emergente resistência à colistina, o uso deste antibiótico em animais está sendo reavaliado. Na União Européia, o monitoramento e a notificação da resistência antimicrobiana em certas bactérias zoonóticas e comensais, e os testes de resistência à colistina tornaram-se obrigatórios a partir de 1 de janeiro de 2014 (Catry *et al.*, 2015). Em novembro de 2016, o Ministério da Agricultura da China proibiu a colistina como aditivo alimentar para promoção de crescimento em animais (Walsh e Wu, 2016). O Departamento de Desenvolvimento da Pecuária da Tailândia retirou então a aprovação do uso de colistina como promotor de crescimento em animais em fevereiro de 2017, enquanto a aprovação do sulfato de colistina para animais teve seu uso revogado pelo governo japonês em 1 de julho de 2018. No Brasil, de acordo com a Instrução Normativa 45/2016, é proibido, em todo território nacional, fabricar e importar sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. Da mesma forma, os governos indiano, malaio e argentino também proibiram o uso de colistina como promotor de crescimento em animais produtores de alimentos (Shen *et al.*, 2020). Apesar desses decretos regulamentares, a colistina continua a ser utilizada para o tratamento de doenças em animais produtores de alimentos e como profilático, resultando em pressão seletiva sobre bactérias de origem animal.

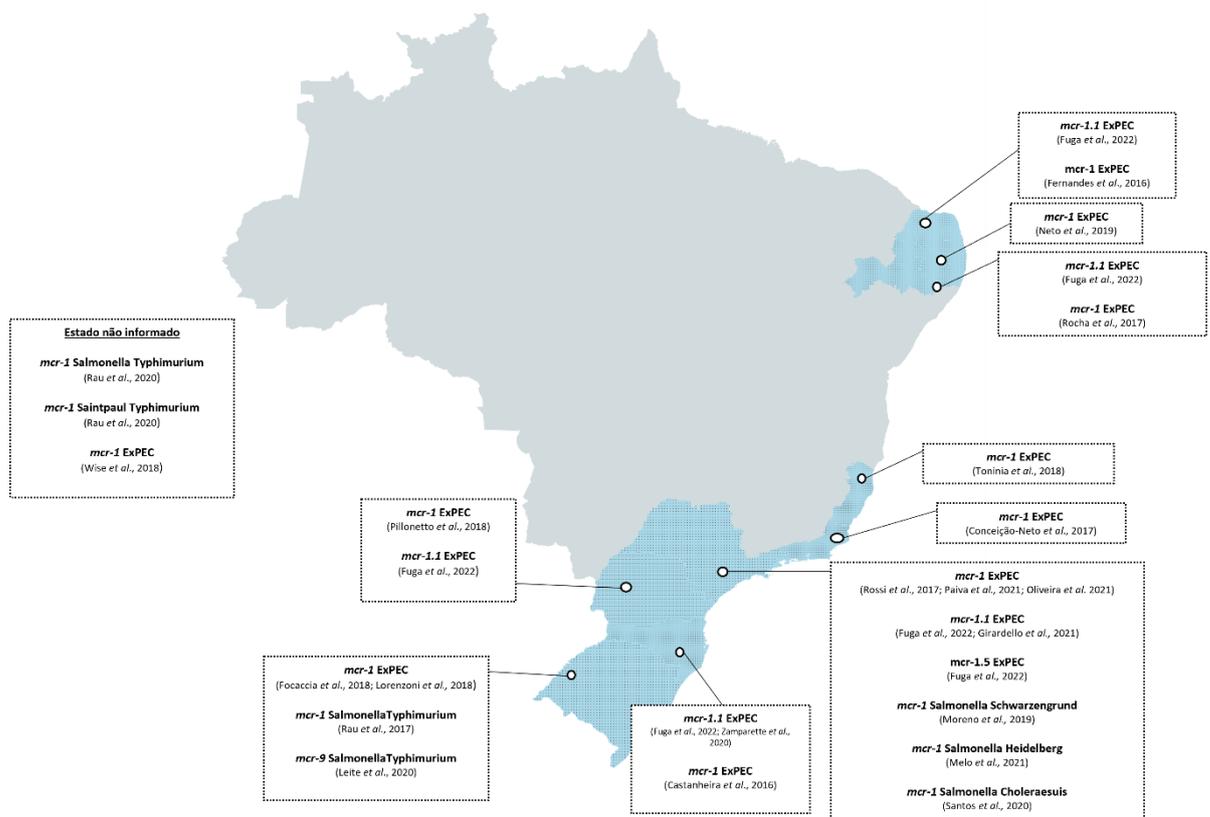
A resistência às polimixinas até o ano de 2015 foi atribuída a mutações cromossômicas, onde há expressão de enzimas transferase pela ativação do sistema de dois componentes (*two-component systems* – TCs), que modificam o LPS por meio da adição de fosfoetanolamina (PEA), neutralizando sua carga negativa e conseqüentemente, diminuindo a permeabilidade do fármaco (Olaitan, Morand e Rolain, 2014; Rolain e Olaitan, 2016).

No final do ano de 2015, Liu e colaboradores identificaram e caracterizaram a resistência mediada por plasmídeo, através da detecção do gene *mcr-1* (*mobile colistin resistance 1*), em uma cepa de *E. coli* na China. Desde então, este gene e suas variações (*mcr-1* a *mcr-10*) se disseminaram em cinco continentes, incluindo Ásia, África, Europa, América e Oceania por

diversos micro-organismos da ordem Enterobacteriales, incluindo *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Cronobacter sakazakii*, *Shigella sonnei*, *Kluyvera spp.*, *Citrobacter spp.* e *Raoultella ornithinolytica* e atualmente são classificados em *mcr-1* ao *mcr-10*. Essa ocorrência generalizada está evidenciando um risco pandêmico significativamente potencial a saúde pública e veterinária (Ling et al., 2020; Liu et al., 2016; Mendes-Oliveira, Paiva e Lima, 2019; Schwarz e Johnson, 2016; Sun et al., 2017; Wang, et al., 2020; Zhang, et al., 2015).

O mecanismo é semelhante ao cromossômico, uma vez que o gene vai codificar a enzima fosfoetanolamina transferase, e esta por sua vez, catalisa a adição de PEA ao lipídio A no LPS, reduzindo a afinidade do antimicrobiano pela membrana externa (Schwarz, Paiva e Lima, 2019; Schwarz e Johnson, 2016; Sun et al., 2017).

Há relatos da circulação do gene *mcr* em ExPEC e *Salmonella spp.* no Brasil, mas os dados são extremamente limitados e escassos como pode ser observado na figura abaixo:



**Figura 2:** Relatos da circulação de *mcr* entre o ano de 2016 e 2022 em *Salmonella* spp de diversas origens e ExPEC no Brasil.

**Fonte:** Própria. Foi realizado uma busca no google acadêmico com as chaves de busca “mcr gene Brazil”, “mcr and Brazil”, “detection mcr Brazil” e “mcr gene Brazil”. Os resultados foram filtrados entre os anos de 2016 e 2022. Mapa atualizado no dia 09 Mar 2022.

Após a primeira detecção do gene *mcr-1* (Liu et al., 2016) na América, a Organização Pan-americana da Saúde (OPAS) emitiu um alerta epidemiológico em junho de 2015 para o monitoramento da detecção de resistência à colistina através de plasmídeos carregando o gene *mcr-1* em Enterobacteriaceae, e desde então, este gene tem sido detectado em diversas origens, e até mesmo em viajantes saudáveis (Daza-Cardona et al., 2022).

## **2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Características gerais do gênero *Salmonella*.**

Pertencem à ordem Enterobacteriales e família Enterobacteriaceae, desde a última atualização (Adeolu *et al.*, 2016). *Salmonella* spp., morfológicamente, são bastonetes gram-negativos e em geral móveis, são anaeróbios facultativos e são produtoras de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S). Taxonomicamente, existem apenas duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica*, que por sua vez, é subdividida em seis subespécies designadas em números romanos: *S. enterica* subsp. *enterica* (I); *S. enterica* subsp. *salamae* (II); *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa); *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb); *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) e *S. enterica* subsp. *indica* (VI). Este patógeno possui atualmente mais de 2500 sorovares, dividido através do esquema de identificação denominado esquema de Kaufmann e White, tendo como base a composição antigênica das salmonelas em relação aos seus antígenos: somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi) (Popoff, 2001; Tortora *et al.*, 2008).

A transmissão humana de *Salmonella* spp. ocorre através da ingestão de alimentos contaminados e pelo contato com animais infectados. No que diz respeito à doença humana, são classificadas em duas categorias: sorotipos tifóides (*S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C [causam a febre tifóide]) e *S. enterica* não-tifoidal (NTS, geralmente causam enterocolite), frequentemente relacionadas com zoonoses. Os micro-organismos, de modo geral, penetram via oral e invadem a mucosa intestinal, multiplicando-se neste local. Ocasionalmente podem atravessar a mucosa intestinal através das células M para penetrar nos sistemas linfático e circulatório, se disseminando para muitos órgãos, que ocorre em casos de infecções invasivas por sorotipos tifóides e até mesmo por NTS, classificados como *S. enterica* não-tifoidal invasiva (NTSi) (Andrews e Ryan, 2015; Ministério Da Saúde, 2011).

### **2.2. Características gerais da espécie *Escherichia coli*.**

Pertencem à ordem Enterobacteriales e família Enterobacteriaceae, desde a última atualização (Adeolu *et al.*, 2016). *E. coli* também é um bacilo Gram-negativo, móvel e diferentemente das espécies de *Salmonella*, não produzem sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S). É um membro da microbiota intestinal do ser humano e outros mamíferos, podendo permanecer no local de forma comensal sem causar nenhuma doença. *E. coli* que adquiriram fatores de virulência e se tornaram patogênicas, são classificadas como: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* de adesão difusa (DAEC). Todos os patótipos de *E. coli* causam diversas doenças intestinais, entretanto algumas podem causar doenças extra-intestinais como bacteremia, infecções do trato urinário e meningites, sendo agrupadas e classificadas como ExPEC, por Russo e Johnson em 2000, por serem epidemiológica e filogeneticamente distintas das demais. Além disso, são incapazes de causar doenças entéricas, podendo colonizar o intestino de mamíferos de forma comensal (Kaper, Nataro e Mobley, 2004; Köhler; Dobrindt, 2011; Russo e Johnson, 2000; Souza *et al.*, 2016).

Atualmente *E. coli* é uma das principais ameaças ao meio ambiente, colocando em risco a saúde humana e ambiental pela disseminação de genes de resistência a antibióticos por meio de plasmídeos, integrons e transposons. Possui uma diversidade de reservatórios, como água, animais de fazenda, produtores de alimentos, etc. (Zhang *et al.*, 2015).

## **2.3. Mecanismos de resistência às polimixinas**

### **2.3.1. Características gerais das polimixinas**

As polimixinas formam um grupo de antimicrobianos polipeptídicos cíclicos, não ribossomais, compostos por 10 aminoácidos isolados do organismo *Paenibacillus polymyxa* (anteriormente *Bacillus polymyxa*)



**Figura 3:** A estrutura geral do peptídeo catiônico cíclico (A) polimixina E (colistina) e (B) polimixina B.

Fonte: (Gogry *et al.*, 2021).

De acordo com as Diretrizes do Consenso Internacional para o Uso Ideal das Polimixinas: ACCP, ESCMID, IDSA, ISAP, SCCM e SIDP, o uso da colistina plasmática recomendada é de 2mg/L. Os dados são escassos para polimixina B, porém, um estudo de meta-análise que fornece resultados quando não há dados quantitativos disponíveis, recomendou 46,7; 58,6 e 78,1 mg hora/L, porém, com risco de desenvolvimento de doença renal (Tsuji *et al.*, 2019). A colistina é a polimixina mais recomendada para uso de tratamento de ITU devido aos efeitos adversos das outras polimixinas. A polimixina B é mais indicada no tratamento de infecções invasivas e reduz a chance de causar nefrotoxicidade. De acordo com o estudo realizado por Tsuji *et al.*, (2019), não se deve utilizar as duas medicações, sendo necessário realizar a escolha, baseando-se nas circunstâncias específicas como citadas anteriormente. É observado uma maior atividade da polimixina B em relação a colistina quando se trata de infecções. Geralmente a polimixina B chega rapidamente em concentrações plasmáticas que podem ser eficazes mesmo em pacientes com problemas renais, ao contrário da colistina que ocorre mais lentamente (Tsuji *et al.*, 2019).

Atualmente a colistina está disponível comercialmente como Colistimetato de Sódio para uso parenteral e terapia com aerossol, e sulfato de colistina para uso oral e tópico. O sulfato de colistina também é muito utilizado no tratamento de infecções intestinais de suínos, aves e bovinos causados principalmente por *Salmonella* spp. e *E. coli* e amplamente utilizado como promotor de crescimento no sistema de produção pecuária (Daza-Cardona *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2015).

Bactérias Gram-negativas desenvolveram resistência às polimixinas por diversas modificações, incluindo modificação no lipídeo A, perda de LPS, bomba de efluxo e formação de cápsula (Huang *et al.*, 2020).

### 2.3.2. Resistência intrínseca

Micro-organismos gram-positivos são intrinsecamente resistentes às polimixinas, pois não possuem membrana externa contendo LPS. Além disso, há bactérias Gram-negativas naturalmente resistentes, como a *Brucella* spp., Complexo *Burkholderia cepacia*, *Edwardsiella* spp., *Morganella morganii*, *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Serratia* spp. Este último caso sendo mais complexo, através da expressão gênica do operon *arnBCADTEF* e *eptB* resultando na adição de moléculas catiônicas ao LPS e por consequência, a afinidade de ligação no local de ação das polimixinas. De modo geral, existem duas principais modificações químicas que tornam e promovem a resistência intrínseca que são as modificações da L-amino-arabinose (L-Ara4N) do lipídio A e a união da fosfoetanolamina (PEA/pEtN transferase) ao grupo 1'-(4')-fosfato de lipídio A (Srinivas e Rivard, 2017; Zhang *et al.*, 2015).

Recentemente, Ricci *et al.*, 2020, demonstraram que a resistência intrínseca a colistina em *Salmonella* spp. está associada à sorovares de específicos, como *S. Enteritidis* e *S. Dublin* (Grupo D). O sequenciamento do genoma completo de um isolado de *S. Enteritidis* sensível à colistina revelou que uma deleção de uma citosina (C) no códon para serina (TCT) na posição do aminoácido 152 na proteína *Rfc* causou uma mudança de quadro (TCT → TT = S152fs) levou a suscetibilidade a colistina. Esta polimerase (*Rfc*) é uma proteína de membrana responsável pela extensão do antígeno O através da adição de unidades repetidas (Ricci *et al.*, 2020). A hipótese é que o truncamento da proteína *Rfc* causado pela mutação *frameshift* ocasiona uma montagem e polimerização ineficiente das subunidades do antígeno O, resultando em um LPS rugoso e uma membrana celular mais permeável. Este estudo demonstrou que o epítipo do antígeno O, seja devido à montagem ineficiente ou substituição por outro tipo, pode governar o nível de suscetibilidade à colistina em *S. enterica*. Os açúcares predominantes nos antígenos O de cepas do grupo B e do grupo D de *Salmonella* são abequose e tivelose, respectivamente. Embora muito semelhante em estrutura, eles diferem apenas na posição de um grupo hidroxila e a hipótese do estudo é

que esta sutil diferença entre abequose e tivelose é a causa da suscetibilidade reduzida a colistina observada nas cepas do estudo.

Nos sorovares do grupo D de *Salmonella*, os genes *rfbSE* codificam as enzimas *CDP-paratose sintase* e *CDP-paratose-2-epimerase*, respectivamente, que catalisa a isomerização de CDP-paratose em CDP-tivelose. Tivelose é o último açúcar que constitui o antígeno O no grupo D de *Salmonella* e é o açúcar que confere o antígeno O9. Ricci *et al.*, 2020, realizaram um estudo onde construíram mutante *crossover*, substituindo os genes *rfbJ* (abequose) e *rfbSE* (tivelose) em *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* respectivamente. Eles observaram que em comparação com a cepa parental, *S. Typhimurium* SL1344, ambos os mutantes *rfbSE* (*S. Enteritidis*) e *rfbSE* (*S. Dublin*) diminuíram a suscetibilidade à colistina (CIM de 3/3,5 µg / ml versus CIM de 0,85 µg/ml). Em comparação com as cepas parentais *S. Enteritidis* NCTC 13349 e *S. Dublin* CT\_02021853, os respectivos mutante *crossover* *rfbJ* tiveram uma suscetibilidade aumentada à colistina (CIM de 1,5 µg/ml vs. CIM de 5,5/6 µg/ml). Apesar de terem sido apontados neste estudo apenas dois genes, outros mecanismos ou mutações ainda não identificados nestes sorovares podem mediar a resistência em colistina (Binsker; Käsbohrer A; Hammerl; 2022).

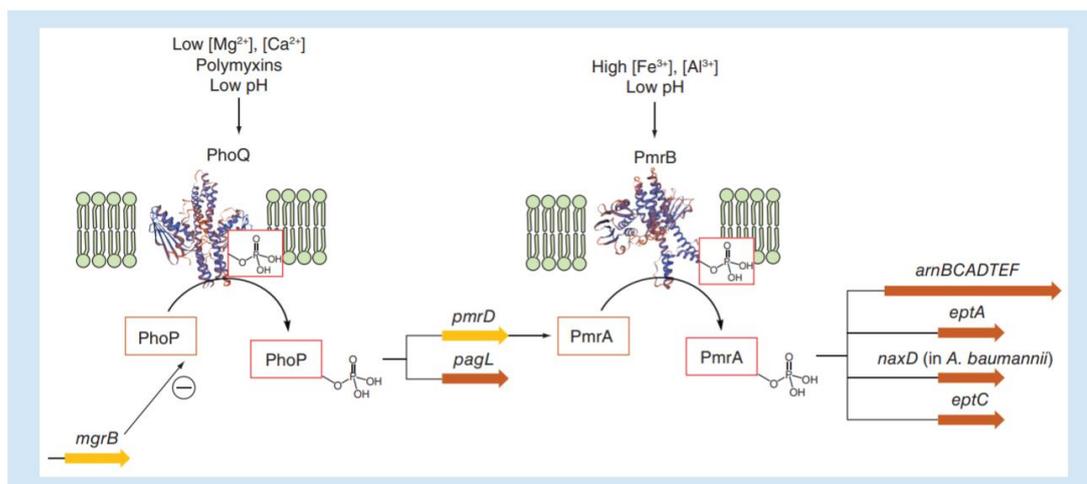
### **2.3.3. Resistência à colistina mediada por cromossomos**

De forma semelhante aos micro-organismos Gram-negativos intrinsecamente resistentes, alguns micro-organismos suscetíveis podem adquirir mutações nas vias celulares que levam à modificação do LPS (Srinivas e Rivard, 2017). Os peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPs) são um conjunto de peptídeos naturais de baixo peso molecular que auxiliam na imunidade inata do hospedeiro, o protegendo de infecções intestinais patogênicas. A resistência a CAMPs é um fator de virulência de grande preocupação nas infecções patogênicas intestinais (Geitani *et al.*, 2019; Goto *et al.*, 2017).

A alteração mais comum e mais efetiva, é a substituição catiônica dos grupos fosfato por L-Ara4N que reduz a carga negativa do lipídeo A como

esquematizado na figura 4 por Huang *et al.* (2020). A ativação do TCs, envolvendo PhoPQ e PmrAB é desencadeada por estímulos ambientais e por mutações específicas dentro do TCs e são cruciais na regulação da expressão de genes que levam a modificação do lipídeo A em bactérias Gram-negativas. Sua ativação leva a uma superexpressão de genes modificadores de LPS. A ativação do TCS PmrAB leva a sobrerregulação do *pmrCAB* e do operon *arnBCADTEF* e operon *pmrE* (*pmrHFIJKLM-ugd*), medeiam a síntese e transferência de PEtN e L-Ara4N para o lipídeo A. O TCs PhoS/PhoQ ativa indiretamente o TCS PmrA/PmrB via PmrD, contribuindo para resistência às polimixinas. Os genes PhoPQ controla níveis de transcrição de muitos genes associados à resistência a CAMPs (mais de 200 genes) e o mesmo pode ser ativado por vários fatores indutores, como baixos níveis de  $Mg^{2+}$ , pH levemente ácido ou CAMPs resultando em sua fosforilação que representa a forma ativa desta molécula, que é capaz de se ligar em regiões promotoras, estimulando ou reprimindo a transcrição gênica de genes como *pagL* e *pmrD* (Goto *et al.*, 2017; Irrgang *et al.*, 2016; Olaitan, Morand e Rolain, 2014; Rolain e Olaitan, 2016).

PmrAB é um dos principais reguladores das modificações no lipídeo A em *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *K. pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Citrobacter rodentium*, *P. aeruginosa* e *A. Baumannii*. De forma geral, assim como no sistema de PhoPQ, PmrAB é desencadeado também uma fosforilação por  $Fe^3$  alto,  $Al^3$  alto e pH baixo levando a transcrição genes de modificação do lipídeo A, são eles: *arnBCADTEF-ugd*, *eptA* e *naxD* (Huang *et al.*, 2020)



**Figura 4:** Regulação de PmrAB e phoPQ na resistência às polimixinas.

Fonte: Huang *et al.* (2020)

Em alguns Gram-negativos como *Klebsiella* spp. os TCs PhoPQ podem ativar diretamente os operons *arnBCADTEF* e *pmrE* independentes de PmrD e PmrAB. O MgrB atua como regulador de feedback negativo para PhoPQ e suprime a via de síntese de L-Ara4N. As mutações ou estímulos ambientais em qualquer destes genes ou TCs mencionados podem levar a uma superprodução da síntese de L-Ara4N, o que conseqüentemente leva a uma carga líquida positiva na membrana da célula bacteriana, prejudicando a capacidade das polimixinas de se ligarem a seus locais de ação (Olaitan, Morand e Rolain, 2014; Rolain e Olaitan, 2016).

### 2.3.4. Mecanismos de resistência adquiridos em bactérias Gram-negativa

Em *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* modificações em genes que regulam as adições químicas de pEtN e L-Ara4N à fração lipídica A são os mecanismos bem descritos de resistência adquirida à colistina. Além destes, há também o que é mediado através da integração genética do elemento de inserção IS *Aba1* a montante do homólogo de PmrC EptA (Zhang *et al.*, 2015).

### 2.3.5. Resistência à colistina mediada por plasmídeo

No final do ano de 2015, Liu e colaboradores identificaram e caracterizaram a resistência mediada por plasmídeo, através da detecção do gene *mcr-1* (*mobile colistin resistance 1*) que codifica uma transferase PEtN, em uma cepa de *E. coli* na China. Isso levou a uma grande preocupação, pois até então, as modificações dos componentes de lipídeo A ou Kdo (*3-deoxy-Dmannooctulosonic acid*) do LPS em organismos Gram-negativos via PmrA/B, PhoP/Q, e as vias de inativação mgrB/R que são cromossomicamente mediadas, impedia a transferência horizontal de genes de resistência entre cepas bacterianas (Liu *et al.*, 2016; Srinivas e Rivard, 2017). O gene de resistência móvel *mcr* é um novo desafio para segurança em saúde pública. Neste caso é importante monitorar rotas envolvidas para controlar a próxima ameaça global a resistência à colistina (Zhang *et al.*, 2015)

A resistência pode ser adquirida por elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, moléculas circulares autônomas de DNA de dupla-fita e são capazes de mobilizar parte do cromossomo entre uma bactéria e outra em um processo denominado recombinação de alta frequência. Genes que conferem resistência aos antibióticos são transferidos por meio da conjugação bacteriana, mediada principalmente por plasmídeos, todavia, alguns elementos móveis como transposons são capazes também de transferir resistência aos antibióticos. Transposons são segmentos de DNA que se deslocam de um local para o outro, tanto no interior quanto entre os DNAs de bactérias, plasmídeos e bacteriófagos (Poirel, Jayol e Nordmanna, 2017).

A partir da descoberta dos plasmídeos, a identificação de suas características e comportamento do plasmídeo em diferentes hospedeiros bacterianos foram e são importantes para entender a disseminação da resistência aos antimicrobianos em gram-negativos. O primeiro esquema de tipagem de plasmídeos foi desenvolvido por Datta e Hedges em 1971 e atualmente existem aproximadamente 48 tipos de Incompatibilidade (Inc) para gram-negativos. Os plasmídeos relacionados com o gene *mcr-1* até o momento, são: IncI2, IncX4, IncX1-X2, IncX3, IncHI1, IncHI2, IncF, IncFI, IncFII, IncFIB, IncFII e IncP. Os plasmídeos da família IncX são restritos a ordem Enterobacteriales há mais de 50 anos e foram isolados desde a era

pré-antibiótica. Pode ser agrupado em seis membros (IncX1, IncX2,...,IncX6) relevantes para disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos e seu tamanho varia entre 30 a 60kb. Os plasmídeos IncX formam plasmídeos cointegrados com os de virulência de *Salmonella* tipo F. O IncX4 é o mais prevalente em *E. coli*, porém, pode ser encontrado em diversos gêneros e espécies de origem diversificadas. Esse plasmídeo tem alto poder de disseminação. Até o momento, todos os plasmídeos que abrigam o gene *mcr-1* reportados no Brasil foram identificados como pertencentes à família IncX4 (Daza-Cardona *et al.* 2022, Dobiasova e Dolejska, 2016; Johnson *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2019; Rozwandowicz *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2017).

### **3.OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo geral do trabalho é identificar e caracterizar os mecanismos que medeiam a resistência a polimixinas em cepas de *Salmonella* spp. e *E. coli* extraintestinal (ExPEC).

#### **3.2. Objetivos específicos**

- ❖ Identificar resistência às polimixinas por teste de triagem (teste da gota) e confirmação por método padrão ouro (microdiluição em caldo);
- ❖ Identificar a presença de mutações nos genes associados à resistência às polimixinas (*pmrA/B*, *phoP/Q*);
- ❖ Identificar genes de resistência plasmidial (*mcr1-10*) às polimixinas;
- ❖ Realizar a tipagem molecular de incompatibilidade plasmidial (Inc type);
- ❖ Verificar se há clonalidade de expansão utilizando a técnica de PFGE;

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Amostras bacterianas**

Os isolados estudados no presente trabalho pertencem a bacterioteca do Laboratório de Enteropatógenos, do Centro de Bacteriologia, do Instituto Adolfo Lutz (IAL). Este projeto foi aprovado pelo Conselho Técnico do IAL (CTC) sob o número CTC-IAL 06-M/2020.

Foi realizada uma triagem pelo teste da gota em 1026 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de origem humana e de origem não humana (alimentos, animais e ambiente) no período de 2016-2018, e 159 cepas de *E. coli* extra-intestinal (ExPEC) isoladas de humanos no período de 2016-2020. As amostras estão armazenadas na bacterioteca do laboratório do Centro de Bacteriologia.

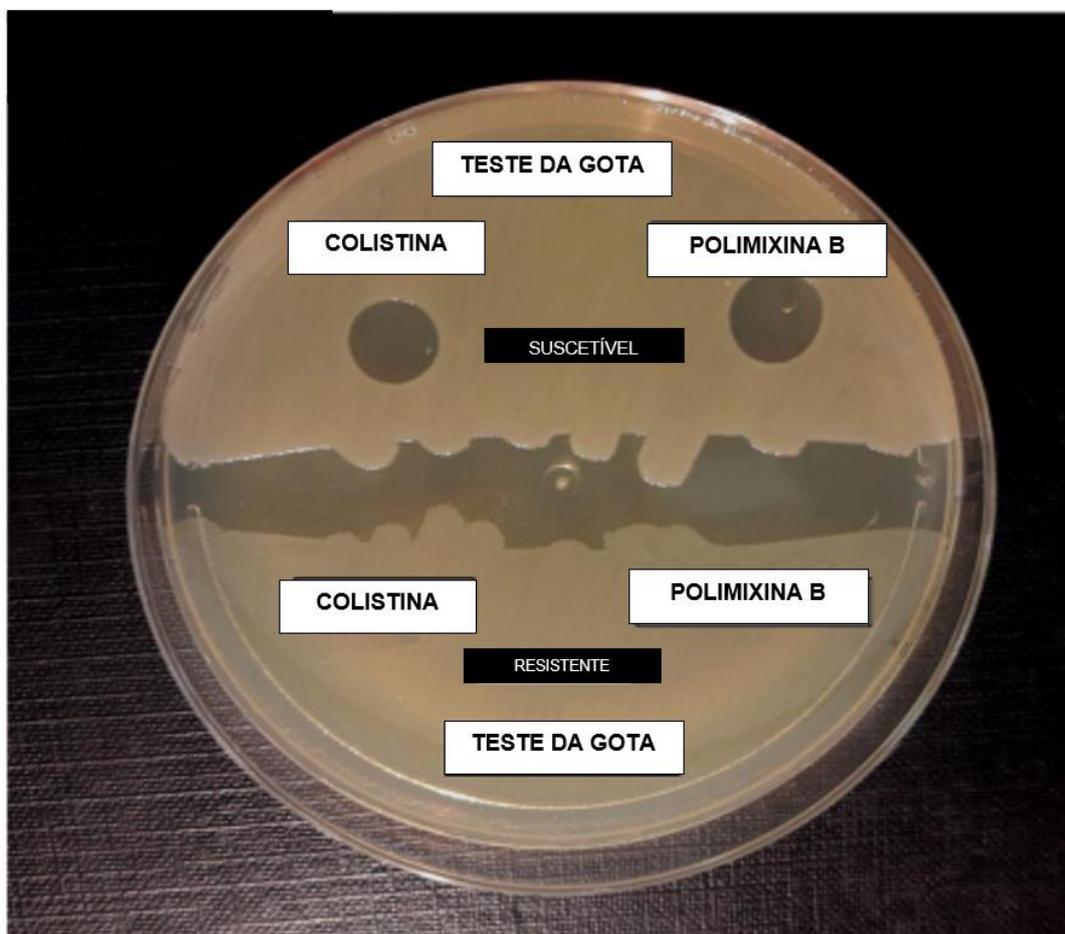
Todas as cepas de salmonela já haviam sido previamente sorotipadas e todos os dados epidemiológicos apresentados foram levantados usando os registros do laboratório.

### **4.2. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos**

#### **4.2.1. Teste da Gota**

A triagem à suscetibilidade às polimixinas foi realizada pelo teste da gota baseado em Pasteran *et al.* (2020), um teste para determinação da susceptibilidade à polimixina B, e colistina em bacilos Gram-negativos. O teste compreende em adicionar 10µl de uma solução de colistina ou polimixina B (16µg/ml em caldo Mueller-Hinton cátion ajustado), sobre uma placa de ágar Mueller-Hinton semeada com a cepa em estudo, em uma suspensão na escala 0,5 de McFarland. Em seguida a placa foi incubada a 37°C e a leitura realizada após 18-20 horas de forma qualitativa, sendo considerado resistente quando houver a ausência do halo de inibição e susceptível na presença do halo (figura 2). As cepas que apresentarem um fenótipo de resistência foram submetidas ao teste de concentração inibitória mínima (CIM) para

confirmação. O teste de microdiluição em caldo é recomendado atualmente tanto pelo CLSI quanto pelo BrCAST para determinação da CIM.



**Figura 5:** Metodologia de teste da gota aplicado em um isolado de *Salmonella* spp.

Fonte: própria.

#### 4.2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo para colistina e polimixina B, recomendado atualmente tanto pelo CLSI quanto pelo BrCAST (EUCAST).

Em uma placa de 96 poços com 50µl de caldo Mueller Hinton cátion ajustado (Difco®) com diferentes concentrações de colistina (0,125 a 64µg/ml), foi adicionado 50µl de de caldo Mueller Hinton cátion ajustado e

suspensão bacteriana (escala 0,5 de McFarland) em diluição 1:150. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 18 horas. Para interpretação dos resultados do CIM são considerados os valores descritos pelo BrCAST e a leitura de forma visual (>2µg/mL resistente). Para validação e controle de qualidade do teste foram utilizadas as cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (BRCAST, 2017b).

### **4.3. Caracterização dos genes de resistência antimicrobiana**

#### **4.3.1. Extração do DNA bacteriano**

As amostras foram cultivadas em placas de ágar comum a 37°C por 18 h e foram feitas uma suspensão bacteriana homogênea contendo 3-4 colônias da cultura pura em água destilada estéril. O material genético bacteriano foi extraído por aquecimento a 100°C durante 15 minutos e posterior centrifugação a 12000 r.p.m durante 10 minutos (JEONG et al., 2011). O sobrenadante obtido ficou armazenado a -20°C para utilização nos testes.

#### **4.3.2. Detecção dos genes de resistência antimicrobiana a colistina (*mcr*) por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Foram pesquisados nas cepas que apresentaram resistência fenotípica às polimixinas, os genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9* e *mcr-10* pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando iniciadores específicos presentes na tabela 1.

Foi feita a reação de PCR de cada amostra em microtubos com volume final de 25 µL, incluindo 9,5 µL de água Milli-Q estéril; 1 µL de cada iniciador específico (*primers*) na concentração final de 0,4 µM (IDT), 12,5 µL de Mix 2x concentrado (Promega) e 1µL de DNA. Os microtubos contendo a reação de PCR foram incubados em termociclador Proflex (Applied Biosystems/EUA) nas seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, temperatura de anelamento de acordo com cada iniciador (Tabela 1) por 45 seg e extensão a 72°C por 1

min. A amplificação foi concluída por 1 ciclo a 72°C de extensão final por 7 min. A sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados, assim como, o tamanho do amplicon em pares de base e referências, encontram-se nesta tabela 1.

**Tabela 1:** Sequência de oligonucleotídeos para os genes *mcr*.

Primers gene <i>mcr</i>				
Primer	Sequência	Alvo	Tamanho (bp)	Referência
<b>mcr-1 F Lescat</b>	ATGCCAGTTTCTTTTCGCGTG	<i>mcr-1</i>	502bp	Lescat, Poirel e Nordmann, 2018.
<b>mcr-1 R Lescat</b>	TCGGCAAATTGCGCTTTTGGC			
<b>mcr-2 F Lescat</b>	GATGGCGGTCTATCCTGTAT	<i>mcr-2</i>	379bp	
<b>mcr-2 R Lescat</b>	AAGGCTGACACCCCATGTCAT			
<b>mcr-3 F Lescat</b>	ACCAGTAAATCTGGTGGCGT	<i>mcr-3</i>	296bp	
<b>mcr-3 R Lescat</b>	AGGACAACCTCGTCATAGCA			
<b>mcr-4 F Lescat</b>	TTGCAGACGCCCATGGAATA	<i>mcr-4</i>	207bp	
<b>mcr-4 R Lescat</b>	GCCGCATGAGCTAGTATCGT			
<b>mcr-5 F Lescat</b>	GGACGCGACTCCCTAACTTC	<i>mcr-5</i>	608bp	
<b>mcr-5 R Lescat</b>	CAACCAGTACGAGAGCACG			
<b>mcr-6 F</b>	GTCCGGTCAATCCCTATCTGT	<i>mcr-6</i>	556bp	
<b>mcr-6 R</b>	ATCACGGGATTGACATAGCTAC			
<b>mcr-7 F</b>	TGCTCAAGCCCTTCTTTTCGT	<i>mcr-7</i>	892bp	Yang et al., 2019.
<b>mcr-7 R</b>	TTCATCTGCGCCACCTCGT			
<b>mcr-8 F</b>	AACCGCCAGAGCACAGAATT	<i>mcr-8</i>	667bp	
<b>mcr-8 R</b>	TTCCCCAGCGATTCTCCAT			
<b>mcr-9 F</b>	CTTTCCATAACAGCGAGACAC	<i>mcr-9</i>	900bp	Yuan et al., 2019
<b>mcr-9 R</b>	GTATCCTTCCTGCCATCCTC			
<b>mcr-10 F</b>	ACCGACCTATTACCAGCGTT	<i>mcr-10</i>	744bp	Xu et al., 2021
<b>mcr-10 R</b>	GCAGATACAGTCCGCTCTCT			

Mcr-1 – mcr-5 Lescat : Multiplex.

#### 4.3.3. Eletroforese em gel de agarose

A eficiência dos testes de PCR e quantificação do produto amplificado foram visualizadas por meio de eletroforese em gel de agarose. O produto da reação de PCR de cada amostra foi misturado ao tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol; 25% de ficoll) e submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Promega/USA), em Tampão TBE 0,5x (1.0M Tris, 0.9 M ácido bórico, 0,01 M EDTA [Invitrogen/USA]). O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com padrão de peso molecular de 100 pb. A visualização das bandas foi feita mediante incubação do gel em solução de brometo de etídio (1,5 mg/mL) por 15 minutos. Para registro, os géis foram fotografados através do sistema MiniBIS

Pro (DNR Bio-Imaging Systems/ISR) e os arquivos foram salvos na extensão .tiff para análise.

#### 4.3.4. Detecção e caracterização de mutações nos genes *pmrA/B* e *phoP/Q*

Nas amostras resistentes a colistina, foi realizada a caracterização dos mecanismos de resistência cromossomal, pela técnica da PCR e posterior, sequenciamento de Sanger, utilizando iniciadores específicos presentes na tabela 2. As cepas tiveram seu DNA extraído conforme descrito no item 4.3.1. Após a extração de DNA, foi realizado a amplificação dos genes *pmrA/B* e *phoP/Q* pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando iniciadores específicos presentes na tabela 2. Os amplicons foram submetidos ao sequenciamento de Sanger descrito no item 4.3.5. Como cepa de referência para identificar as mutações, foi utilizada *S. Typhimurium* LT2 (GenBank: GCA\_000006945.2) e *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 (GenBank: NC\_000913.3)

**Tabela 2:** Sequência de oligonucleotídeos para detecção de resistência cromossomal a colistina.

Primers <i>pmrAB/phoPQ</i>					
Primer	Sequência	Alvo	Tamanho (bp)	Referência	
<i>Salmonella</i>					
<i>S-pmrA</i> F	CGCGAATTTTCGTGCATGATATG	<i>pmrA</i>	800	Sun <i>et al.</i> , 2009	
<i>S-pmrA</i> R	ATGTCCCGATGCTCATTGGGC	<i>pmrA</i>			
<i>S-pmrB</i> F	AGGAAATTCTGGGCGAGCA	<i>pmrB</i>	1300		
<i>S-pmrB</i> R	CGTTTTTCAGCGAAGAGCGA	<i>pmrB</i>			
<i>phoP</i> F	AGAGATGATGCGCGTACTGG	<i>phoP</i>	600	Ethica <i>et al.</i> , 2019	
<i>phoP</i> R	TGACATCGTGCGGATACTGG	<i>phoP</i>			
<i>phoQ</i> F	AAACCACCTTTCGTTTGCTG	<i>phoQ</i>	1000		
<i>phoQ</i> R	TCTTCTGTGTGGGATGCTG	<i>phoQ</i>			
<i>E. coli</i>					
<i>S-pmrA</i> F	AGTTTTCTCATTTCGCGACCA	<i>pmrA</i>	714		Quesada <i>et al.</i> , 2015
<i>S-pmrA</i> R	TACCAGGCTGCGGATGATATTCT	<i>pmrA</i>			
<i>S-pmrB</i> F	GGATGGCCTGATGTGACGCTGTC	<i>pmrB</i>	1312		

<i>S-pmrB</i> R	GCGCGGCTTTGGCTATATGCTG	<i>pmrB</i>		
<i>phoP</i> F	ATGCGCGTACTGGTTGTTG	<i>phoP</i>	747	
<i>phoP</i> R	AGTACTACCGCTGCCGTTGCC	<i>phoP</i>		Zakaria et al., 2021
<i>phoQ</i> F	CAGGGCTATCTGTTTCAATTGCG	<i>phoQ</i>	1523	
<i>phoQ</i> R	ACGGATGCTTAACGTAATGCGTG	<i>phoQ</i>		

#### 4.3.5. Sequenciamento pelo método de Sanger

Os fragmentos obtidos para os genes detectados pela técnica de PCR foram purificados pela enzima ExoSAP-IT (Affymetrix-USB/EUA). Para cada 5µL de produto da PCR, foi adicionado 1µL de ExoSAP-IT, incubado a 37°C por 15 minutos e, posteriormente, à 80°C para inativação enzimática. Para reação de sequenciamento utilizando o método de Sanger foi utilizado o kit ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems).

Para cada reação de sequenciamento, utilizou-se 0,875µL de tampão e 0,875µL de água, 0,25µL de BigDye e 2µL de primers. O volume total da reação de sequenciamento foi de 5µL (adicionando-se 1µL de DNA purificado). O programa da reação de sequenciamento foi de 30 ciclos (95°C/20seg, 50°C/15seg, 60°C 1min).

Após o término da reação de PCR do sequenciamento, o material foi precipitado adicionando 3µL de Acetato de Sódio 3M (NaOAc), 62,5µL de álcool 95% e 14,5µL de água ultrapura para cada reação de sequenciamento (total de 80µL). As placas foram centrifugadas à 3500 r.p.m. por 45min e o conteúdo desprezado. Após um spin invertido nas placas, foi adicionado 15µL de etanol 70% e centrifugadas à 3500 r.p.m. por 10min. A solução foi desprezada novamente e realizado um spin invertido nas placas. Aguardou a secagem completa das placas para armazenar à -20°C. Foi realizada a ressuspensão do conteúdo das placas utilizando formamida para abertura das fitas, com aquecimento a 96°C por 3min. Posteriormente, as placas foram inseridas no sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems) em sistema capilar e analisados no software Bionumerics (Applied Maths) versão 8.0.

#### **4.4. Técnica de PFGE**

A técnica de “*Pulsed-field gel electrophoresis*” (PFGE) foi realizada nas cepas positivas para o gene *mcr*. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo da rede PulseNet ([www.cdc.gov/pulsenet/protocols](http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols); Hunter et al., 2005).

##### **4.4.1. Preparo das Amostras**

Os isolados de *E.coli* foram reativados em placas de TSA e incubados em estufa a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 18 horas. No dia seguinte, foi selecionada uma colônia e semeada em placa de TSA, com auxílio de *swab* onde foi possível obter um crescimento confluyente. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 18 horas.

##### **4.4.2. Crescimento Bacteriano e Lise Celular**

As suspensões bacterianas foram preparadas em tampão de suspensão celular e medidas no espectrofotômetro (Analyser®), utilizando uma densidade ótica (DO) de 0,8 a 1,0 em absorvância de 610 nm. Foram transferidos 300  $\mu\text{L}$  das suspensões celulares a cada microtubo de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 15  $\mu\text{L}$  de proteinase K na concentração final de 0,5 mg/mL. Foram acrescentados 300  $\mu\text{L}$  de agarose Seakem Gold 1% em Tampão TE (Tris-EDTA), mantida em banho-maria a  $50^\circ\text{C} - 55^\circ\text{C}$ , em cada uma das amostras, e a mistura foi depositada em moldes reutilizáveis, obtendo-se os *plugs* de gel de agarose. Após solidificação por 15 min em temperatura ambiente, três *plugs* de cada amostra foram dispensados em tubos cônicos de polipropileno (50 mL) contendo 5 mL de solução tampão de lise celular, acrescido de 25  $\mu\text{L}$  proteinase K para concentração final de 0,1 mg/mL.

A lise do DNA bacteriano foi feita durante 2 horas a  $54^\circ\text{C}$  em incubadora (New Brunswick) com agitação de 150 rpm. Após descartar a solução de lise de cada tubo, duas lavagens com 10-15 mL de água ultrapura

estéril pré-aquecida a 50°C foram feitas por 15 minutos cada lavagem a 50°C com agitação. Seis lavagens subsequentes dos *plugs*, com 10 mL de tampão TE pré-aquecido a 50°C, foram realizadas nas mesmas condições descritas acima. Após a última lavagem, foram acrescentados 5 mL de tampão TE em temperatura ambiente aos *plugs* de agarose que foram mantidos a 4°C até o momento de uso.

#### 4.4.3. Digestão do DNA

Cada *plug* de agarose contendo o DNA lisado da amostra foi cortado no tamanho de 2 mm de largura e colocados em tubo contendo a solução para digestão enzimática com os seguintes componentes:

Para uma amostra:

- Água estéril qualidade molecular (Promega): 175 µL;
- Tampão da enzima (Promega): 20 µL;
- BSA 1x (Promega): 2 µL
- Enzima *Xba*I (Promega) (10U/µL): 3 µL
- Volume total por amostra: 200 µL

Em seguida, os tubos com os *plugs* foram incubados em banho-maria a 37°C por 18 horas.

#### 4.4.4. Gel de eletroforese em campo pulsado

A corrida em campo pulsado no aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad) foi realizada com agarose Seakem Gold® (Lonza/USA) 1% (equilibrada por 20 min em banho maria a 50-55°C) preparada em tampão TBE 0,5x (1.0M Tris, 0.9 M ácido bórico, 0,01 M EDTA [Invitrogen/USA]) com os seguintes parâmetros para *Salmonella*: Tempo inicial: 2,2 segundos, tempo final: 63,8 segundos, e tempo de corrida: 18:30 horas (CHEF-DR III [Bio-Rad/USA]) e os

seguintes parâmetros para *E. coli* (Tempo inicial: 6.76 segundos, tempo final: 35.38 segundos, e tempo de corrida: 17-20 horas. A visualização das bandas foi feita mediante incubação do gel em solução de brometo de etídio (1,5 mg/mL) por 30 minutos e descorado em água destilada por 40 minutos. Para registro, os géis foram fotografados através do sistema MiniBIS Pro (Bio-Imaging Systems) e os arquivos salvos na extensão Tiff para a análise pelo software BioNumerics® (Applied Maths/Bélgica) atualmente disponível na versão 8.0 e CGE – *Center for Genomic Epidemiology* (<https://www.genomicepidemiology.org/>).

#### **4.4.5. Análise do Perfil Genético**

As imagens foram analisadas no programa BioNumerics (Applied Maths, Bélgica). O resultado foi gerado pela observação dos fragmentos de restrição, após a corrida eletroforética, comparando o padrão de restrição entre as amostras analisadas. Os dendrogramas para a análise da similaridade genética entre os isolados foram construídos pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group using Mathematical Average Taxonomy*), utilizando-se o coeficiente de Dice, com otimização e tolerância de 1,5%, seguindo as instruções da Rede PulseNet. Para normalização dos géis, o marcador de peso molecular foi disposto em três linhas de cada gel. Uma diferença de pelo menos um fragmento nos padrões foi considerada para distinção entre os diferentes perfis

#### **4.5. Tipagem dos grupos de incompatibilidade (*Inc Type*) plasmidial**

Cada cepa foi submetida à PCR para a tipagem dos replicons plasmidiais para a identificação dos principais grupos de incompatibilidade plasmidial: FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Iy, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, FIIA, U, R, ColE e X4 (CARATTOLI *et al.*, 2005, 2014; MUTAI *et al.*, 2019, Shafiq *et al.*, 2019). O DNA foi obtido conforme descrito no item 4.3.1.

Para a PCR foram utilizados os primers da tabela 3, os reagentes e concentrações indicadas pelo fabricante. As soluções foram pré-aquecidas a 94°C/10' e submetidas a 30 ciclos de: 94°C/1', temperatura de anelamento de acordo para cada iniciadores e temperatura de extensão de 72°C/2' e, em seguida, 72°C/7'. O termociclador Proflex (Applied Biosystems/EUA) foi utilizado para a execução das reações de PCR. A eficiência dos testes de PCR e quantificação do produto amplificado foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose.

**Tabela 3:** Iniciadores utilizados na técnica de *PCR para a tipagem dos replicons plasmidiais*.

Inctype	Sequência de primers (5'-3')	T°	(pb)
HI1 F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	60	471
HI1 R	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA		
HI2 F	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC	60	644
HI2 R	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT		
I1 F	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	60	139
I1 R	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
X F	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	60	376
X R	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC		
L/M F	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG	60	785
L/M R	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG		
N F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	60	559
N R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		
FIA F	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	60	462
FIA R	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG		
FIB F	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	60	702
FIB R	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT		
W F	CCTAAGAACAACAAGCCCCCG	60	242
W R	GGTGCGCGGCATAGAACCGT		
Y F	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	60	765
Y R	GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT		

P F	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	60	534
P R	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC		
FIC F	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	60	262
FIC R	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT		
A/C F	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	60	465
A/C R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		
T F	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	60	750
T R	CGTTGATTCACCTTAGCTTTGGAC		
FII <sub>s</sub> F	CTGTCGTAAGCTGATGGC	60	270
FII <sub>s</sub> R	CTCTGCCACAAACTTCAGC		
F <sub>repB</sub> F	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	52	270
F <sub>repB</sub> R	GAAGATCAGTCACACCATCC		
K/B F	GCGGTCCGAAAAGCCAGAAAAC	60	160
K R	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA		
B/O R	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	60	159
U F	TCACGACACAAGCGCAAGGG		
U R	TCATGGTACATCTGGGCGC	60	843
R F	TCGCTTCATTCCTGCTTCAGC		
R R	GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA	60	251
ColE F	GTTTCGTGCATACAGTCCA		
ColE R	GGCGAAACCCGACAGGACT	60	187
ColE <sub>TP</sub> R	GGTTTACCGGTGTCATTCC	60	106
IncX4F	AGCAAACAGGGAAAGGAGAAGACT	60	569
IncX4R	TACCCCAAATCGTAACCTG		

T°: Temperatura de anelamento; pb: pares de base

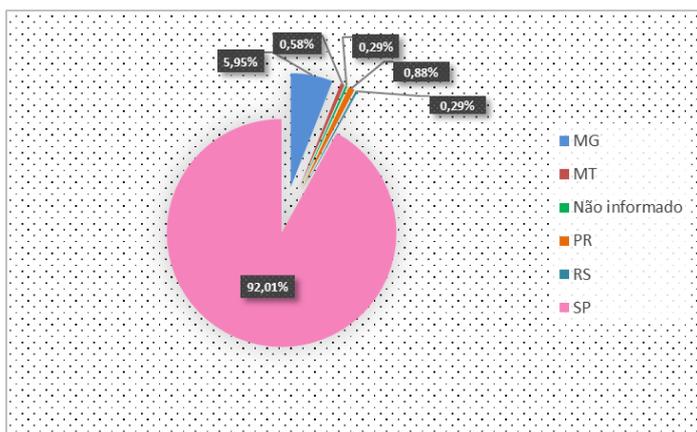
## **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Dados epidemiológicos das amostras estudadas

Foi realizado o estudo em 1026 cepas de *Salmonella* spp., isoladas de infecções humanas e de origem não humana, (animais, alimento e ambiente) isoladas no período de 2016-2018, e 159 cepas de *E. coli* Extra-intestinal (ExPEC) isoladas de humanos no período de 2016-2020, que equivalem ao número total de cepas recebidas neste período.

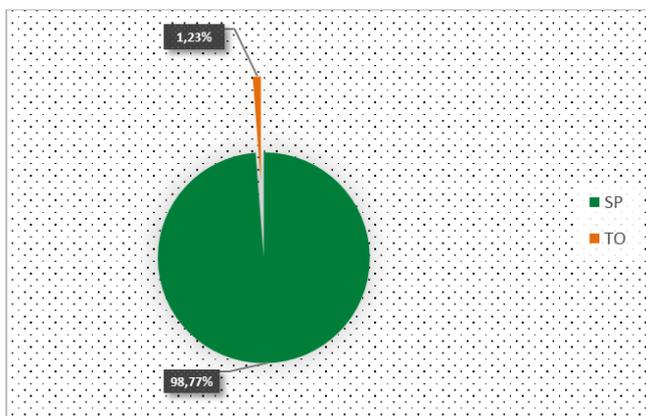
As cepas de *Salmonella* spp. foram provenientes dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul. Destas, cerca de 90% pertenciam ao estado de São Paulo, seguido do estado de Minas Gerais, que compreendia aproximadamente 6% do total (Gráfico 1).



**Legenda:** MG: Minas Gerais; MT: Mato Grosso; PR: Paraná; RS: Rio Grande do Sul; SP: São Paulo.

**Gráfico 1:** Distribuição geográfica de isolados de *Salmonella* spp. nos anos de 2016-2018.

As cepas de *E. coli* Extra-intestinal foram provenientes dos estados de São Paulo e Tocantins, sendo que 98% pertenciam ao estado de São Paulo (gráfico 2).



**Legenda:** MG: Minas Gerais; TO: Tocantins; SP: São Paulo.

**Gráfico 2:** Distribuição geográfica dos isolados de *E. coli* nos anos de 2016-2020.

Entre os isolados de *Salmonella spp.*, pode-se verificar a prevalência dos sorovares identificados ao ano, através do mapa de calor (tabela 4). Podemos observar que o sorovar identificado com maior prevalência nos anos de 2016 e 2017 foi Enteritidis e em 2018, foi o sorovar Heidelberg.

**Tabela 4:** Resultados da prevalência de sorotipos de *Salmonella spp.* por ano (2016-2018).

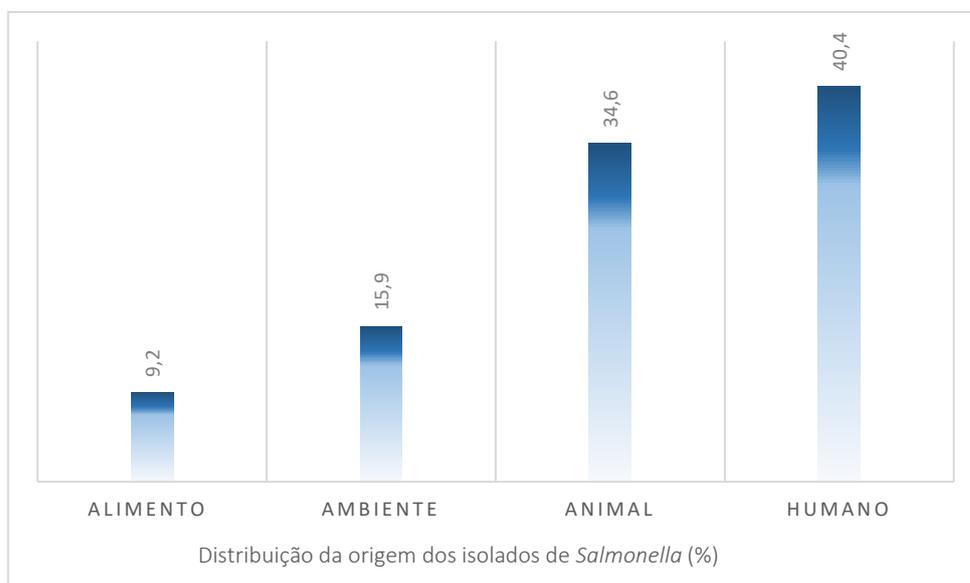
Sorovar (Isolados)	Ano			Total Geral
	2016	2017	2018	
Abaetuba	1	1	3	5
Adelaide			3	3
Agona	4	1	7	12
Alachua			3	3
Albany			1	1
Anatum	3	1	1	5
Bovismorbificans	1		1	2
Braenderup	13	3	11	27
Brandenburg	1	8		9
Bredeney	1	1		2
Cerro	11		15	26
Choleraesuis			2	2
Corvallis	3		1	4
Cotia	1			1
Derby			18	18
Dublin	10	11	16	37
Enteritidis	72	37	21	130

Gallarum	1	3		4
Give	1		5	6
Glostrup		1		1
Hadar		2	3	5
Havana	2			2
Heidelberg	11	28	90	129
Idikan	1			1
Infantis	20	4	12	36
Inganda			4	4
Javiana	19	2	11	32
Kastrup		1		1
Kentucky	3	1		4
Livingstone	1	1	2	4
Mbandaka	4		27	31
Meleagridis			2	2
Miami	13	1	1	15
Minnesota		2	10	12
Molade	3		1	4
Montevideo	2	1		3
Muenchen	2	1		3
Muenster	25		2	27
Newport	7	2	8	17
Ohio		1		1
Oranienburg	3	2	7	12
Orion	3	2		5
Ouakam			1	1
Panama	8	3	6	17
Paratyphi B		1		1
Poona	4	1	2	7
Potsdam	1			1
Pullorum		1		1
Rissen	2		6	8
Rubislaw	2		1	3
S. l.6,7:e,h:-			1	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	1			1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (Rugosa)	1	3	24	28
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> 6,8:-:-			1	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> 0:21:-:-			3	3
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	2	1		3
S. l.1,3,19:-:-	1			1
S. l.21:-:-			1	1
S. l.3,10:-:-		1		1
S. l.3,10:-:1,7			1	1
S. l.4,12:-:1,2			2	2
S. l.4,12:-:e, n, z15			1	1
S. l.4,5,12,27:d:-			1	1
S. l.4,5,12: eh:-			1	1
S. l.4,5,12:i:-	61	14	8	83

S. I.4,5:b:-		1		1
S. I.4.12:d:-			1	1
S. I.42:r:-		1		1
S. I.6,8: eh:-	1		2	3
S. I: 4,12:r:-			1	1
S. II 42:r:-	2			2
S. III 61: c: Z35	1			1
S. IV 21: Z4, Z23:-	1			1
S. IV 43: g, z51:-	1	1		2
SaintPaul	8	13	10	31
Sandiego	1	10	2	13
Saphra			4	4
Schwarzengrund	9	2	19	30
Sendai			1	1
Senftenberg	2	1	7	10
Tennessee	1		4	5
Typhi		4	10	14
Typhimurium	31	17	31	79
Worthington	1	1		2
Yoruba	2	2	1	5
Zega			3	3
Total Geral	386	196	444	1026

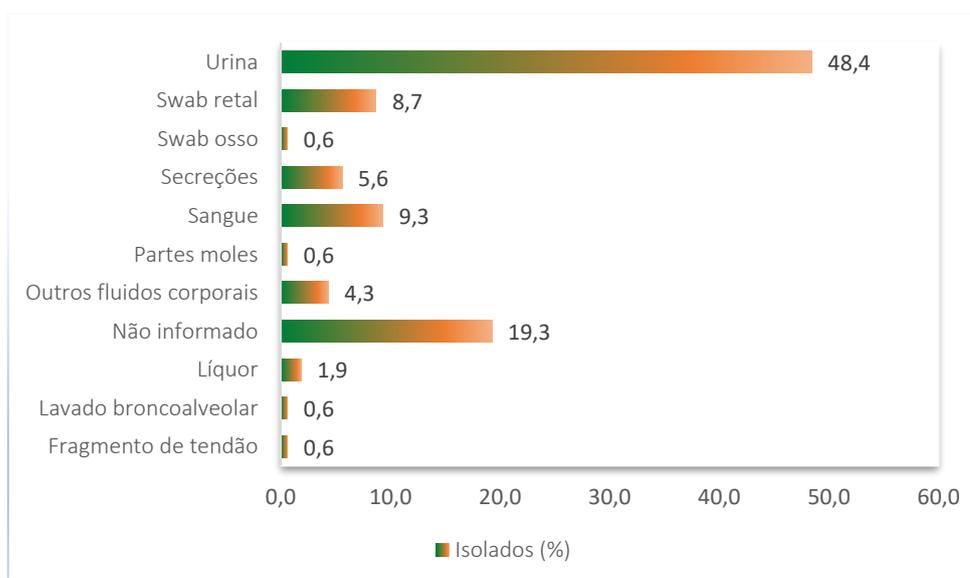
Entre os 1026 isolados de *Salmonella spp.* estudados, 40,4% eram amostras isoladas de origem humana, 34,6% amostras de origem animal,

15,4% amostras ambientais, 9,2% de amostras provenientes de alimentos e 9,6% de amostras cuja origem não foi informada (gráfico 3).



**Gráfico 3:** Distribuição da origem dos isolados de *Salmonella* spp. nos anos de 2016 a 2018.

Entre os 159 isolados de ExPEC estudados, 48,4% foram isolados de urina, 9,3% sangue, 1,9% líquido, 5,6% secreções e outros 34,8% descritos conforme gráfico 4.



**Gráfico 4:** Origem dos isolados de *E. coli* nos anos de 2016-2020.

## 5.2. Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana

### 5.2.1. Triagem pelo teste da Gota em *Salmonella*

Os resultados do teste da gota demonstraram que 190 isolados de *Salmonella* spp. (18,5% de um total de n=1026), foram caracterizados como resistentes a colistina e 135 a polimixina B.

Na tabela 5 estão listados os sorovares de *Salmonella* spp. que apresentaram resistência às polimixinas, sendo os principais aqueles encontrados no grupo somático O9, como: Dublin, Enteritidis, Gallinarum, Pullorum. Também tem destaque os sorovares Minnesota, Rubislaw, Schwarzengrund, Brandenburg e Sandiego.

**Tabela 5:** Resultados do teste de suscetibilidade à colistina e polimixina B através do teste da gota entre os sorovares de *Salmonella* spp. isolados nos anos de 2016-2018.

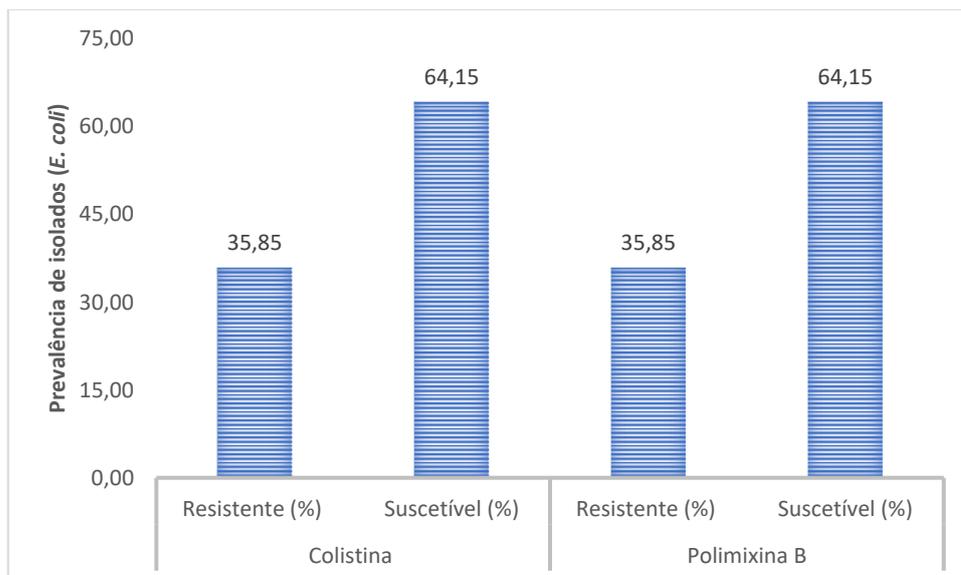
Sorovar	Suscetibilidade a colistina no teste da gota		Total	Suscetibilidade a Polimixina B no teste da gota		Total
	Resistente	Susceptível		Resistente	Susceptível	
Abaetuba	0	5	5	0	5	5
Adelaide	0	3	3	0	3	3
Agona	0	12	12	0	12	12
Alachua	0	3	3	0	3	3
Albany	0	1	1	0	1	1
Anatum	0	5	5	0	5	5
Bovismorbificans	0	2	2	0	2	2
Braenderup	1	26	27	1	26	27
Brandenburg	2	7	9	1	8	9
Bredeney	0	2	2	0	2	2
Cerro	1	25	26	1	25	26
Choleraesuis	1	1	2	1	1	2
Corvallis	0	4	4	0	4	4
Cotia	0	1	1	0	1	1
Derby	1	17	18	0	18	18
Dublin	22	15	37	18	19	37
Enteritidis	90	40	130	62	68	130
Gallinarum	3	1	4	3	1	4
Give	0	6	6	0	6	6
Glostrup	0	1	1	0	1	1
Hadar	0	5	5	0	5	5
Havana	0	2	2	0	2	2

Heidelberg	12	117	129	9	120	129
Idikan	0	1	1	0	1	1
Infantis	2	34	36	1	35	36
Inganda	0	4	4	0	4	4
Javiana	4	28	32	2	30	32
Kastrup	0	1	1	0	1	1
Kentucky	0	4	4	0	4	4
Livingstone	0	4	4	0	4	4
Mbandaka	1	30	31	0	31	31
Meleagridis	0	2	2	0	2	2
Miami	4	11	15	3	12	15
Minnesota	6	6	12	4	8	12
Molade	0	4	4	0	4	4
Montevideo	0	3	3	0	3	3
Muenchen	0	3	3	0	3	3
Muenster	0	27	27	0	27	27
Newport	1	16	17	0	17	17
Ohio	0	1	1	0	1	1
Oranienburg	1	11	12	1	11	12
Orion	0	5	5	0	5	5
Ouakam	0	1	1	0	1	1
Panama	5	12	17	4	13	17
ParatyphiB	0	1	1	0	1	1
Poona	0	7	7	0	7	7
Potsdam	0	1	1	0	1	1
Pullorum	1	0	1	1	0	1
Rissen	0	8	8	0	8	8
Rubislaw	1	2	3	1	2	3
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	1	0	1	1	0	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (Rugosa)	0	1	1	0	1	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> 6,8:-:-	1	27	28	1	27	28
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> O:21:-:-	0	1	1	0	1	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	0	3	3	0	3	3
<i>S. I.1,3,19:-:-</i>	0	3	3	0	3	3
<i>S. I.21:-:-</i>	0	1	1	0	1	1
<i>S. I.3,10:-:-</i>	0	1	1	0	1	1
<i>S. I.3,10:-:1,7</i>	1	0	1	1	0	1
<i>S. I.4,12:-:1,2</i>	0	1	1	0	1	1
<i>S. I.4,12:-:e,n,z15</i>	0	2	2	0	2	2
<i>S. I.4,5,12,27:d:-</i>	0	1	1	0	1	1
<i>S. I.4,5,12:eh:-</i>	0	1	1	0	1	1
<i>S. I.4,5,12:i:-</i>	0	1	1	0	1	1
<i>S. I.4,5:b:-</i>	15	68	83	11	72	83
<i>S. I.4.12:d:-</i>	0	1	1	0	1	1

S. I.42:r:-	0	1	1	0	1	1
S. I.6,7:e,h:-	0	1	1	0	1	1
S. I.6,8:eh:-	0	3	3	0	3	3
S. I: 4,12:r:-	0	1	1	0	1	1
S. II 42:r:-	0	2	2	0	2	2
S. III 61:c:Z35	0	1	1	0	1	1
S. IV 21:Z4,Z23:-	0	1	1	0	1	1
S. IV 43:g,z51:-	0	2	2	0	2	2
SaintPaul	2	29	31	2	29	31
Sandiego	3	10	13	1	12	13
Saphra	0	4	4	0	4	4
Schwarzengrund	5	25	30	3	27	30
Sendai	0	1	1	0	1	1
Senftenberg	0	10	10	0	10	10
Tennessee	0	5	5	0	5	5
Typhi	1	13	14	0	14	14
Typhimurium	2	77	79	2	77	79
Worthington	0	2	2	0	2	2
Yoruba	0	5	5	0	5	5
Zega	0	3	3	0	3	3
Total	<b>190</b>	<b>836</b>	<b>1026</b>	<b>135</b>	<b>891</b>	<b>1026</b>

### 5.2.2. Triagem pelo teste da Gota em *E. coli*

Nos testes de triagem para suscetibilidade às polimixinas (polimixina B e colistina), 64,15% dos isolados de ExPEC (n=102) foram sensíveis e 35,85% dos isolados (n=57) foram resistentes como observado no gráfico 5.

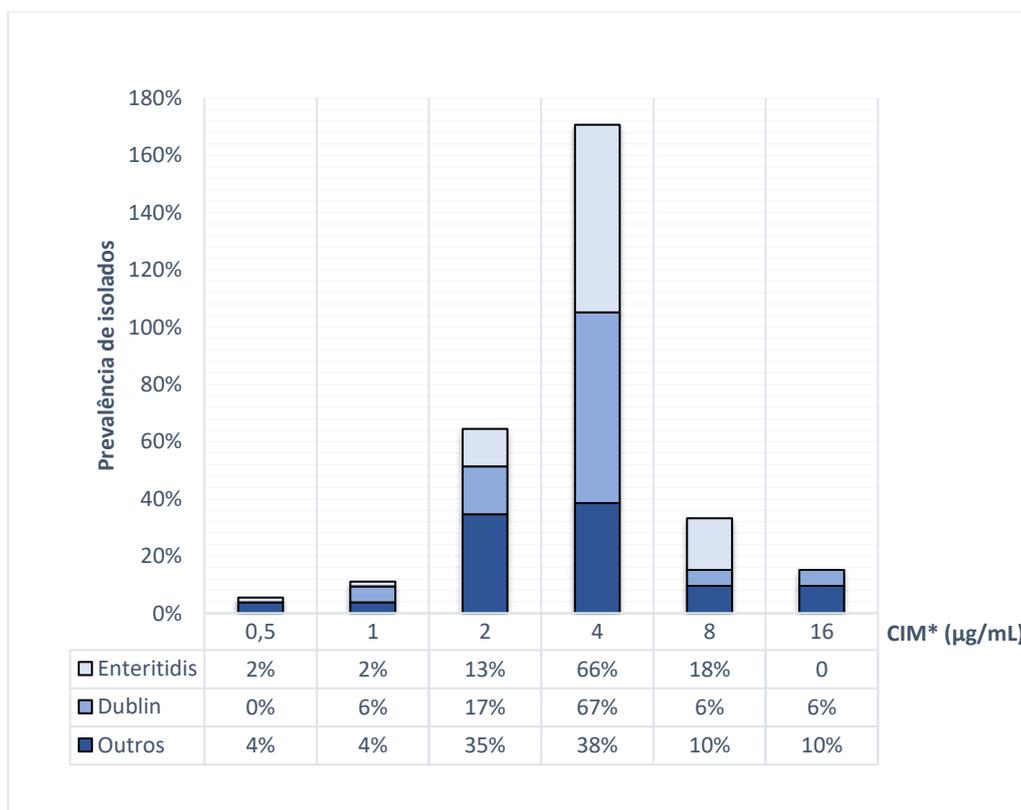


**Gráfico 5:** Resultados do teste de suscetibilidade à colistina e polimixina B através do teste da gota entre isolados de *E. coli* nos anos de 2016-2020.

### 5.2.3- Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Foi determinada a concentração mínima inibitória dos 190 isolados de *Salmonella* resistentes a colistina e polimixina B pelo teste da gota. Do total, 124 isolados foram resistentes a ambos antibióticos através da determinação da CIM. Destes, 63 isolados (51%) apresentaram CIM igual 4µg/mL, 51 isolados (41%) apresentaram CIM igual 8µg/mL e 10 isolados (8%) apresentaram CIM igual 16µg/mL para colistina.

Os sorotipos Enteritidis e Dublin foram os mais frequentemente identificados com resistência às polimixinas. Enquanto 66% dos isolados de Enteritidis apresentaram CIM igual 4µg/mL, 67% dos isolados de *S. Dublin* apresentaram CIM igual 4µg/mL (Gráfico 6). O resultado da CIM obtida por sorotipo pode ser observada de forma mais detalhada na tabela 6.



**Gráfico 6:** Resultados da CIM\* da colistina por sorotipo em Salmonella resistentes para colistina e polimixina B.

\*CIM: Concentração inibitória mínima.

**Tabela 6:** Distribuição detalhada de CIM obtida por sorotipo (2016-2018)

Sorotipo	CIM(µg/mL)													
	Colistina							Polimixina B						
	0,5	1	2	4	8	16	Total	0,5	1	2	4	8	16	Total
Braenderup	0	0	0	0	1	0	<b>1</b>	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>
Brandenburg	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>
Cerro	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>
Choleraesuis	0	0	0	0	0	1	<b>1</b>	0	0	0	0	0	1	<b>1</b>
Derby	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>	0	0	1	0	0	0	<b>1</b>
Dublin	0	0	1	15	5	2	<b>23</b>	0	1	7	13	1	1	<b>23</b>
Enteritidis	0	2	2	52	34	1	<b>91</b>	1	2	20	51	17	0	<b>91</b>
Gallinarum	0	0	0	2	1	0	<b>3</b>	0	0	1	1	1	0	<b>3</b>
Heidelberg	0	0	1	3	4	3	<b>11</b>	0	0	3	4	1	3	<b>11</b>
Infantis	0	0	1	1	0	0	<b>2</b>	0	1	1	0	0	0	<b>2</b>
Javiana	1	0	1	0	2	0	<b>4</b>	1	1	1	1	0	0	<b>4</b>
Mbandaka	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>	0	0	1	0	0	0	<b>1</b>
Miami	0	0	0	4	0	0	<b>4</b>	0	0	1	3	0	0	<b>4</b>

Minnesota	0	0	1	4	1	0	<b>6</b>	0	1	3	2	0	0	<b>6</b>
Newport	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>
Oranienburg	0	0	0	0	0	1	<b>1</b>	0	0	0	0	0	1	<b>1</b>
Panama	0	1	1	3	0	0	<b>5</b>	1	0	3	1	0	0	<b>5</b>
Pullorum	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>	0	0	1	0	0	0	<b>1</b>
Rubislaw	0	0	0	0	1	0	<b>1</b>	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (Rugosa)	0	0	0	0	0	1	<b>1</b>	0	0	0	0	0	1	<b>1</b>
S. l. 4, 5, 12: i: -	0	1	1	11	1	0	<b>14</b>	0	1	9	4	0	0	<b>14</b>
S. l.3,10:-:-	0	0	0	0	1	0	<b>1</b>	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>
S. l. 4,5,12: i: -	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>
S. l. 6, 7: e,h: -	0	0	0	0	1	0	<b>1</b>	0	0	0	0	1	0	<b>1</b>
Saintpaul	0	0	0	1	1	0	<b>2</b>	0	0	0	2	0	0	<b>2</b>
Sandiego	0	0	0	1	1	0	<b>2</b>	0	0	1	0	1	0	<b>2</b>
Schwarzengrund	0	1	0	2	1	1	<b>5</b>	0	1	1	2	1	0	<b>5</b>
Typhi	0	0	0	1	0	1	<b>2</b>	0	0	0	1	0	1	<b>2</b>
Typhimurium	0	0	0	2	0	0	<b>2</b>	0	0	2	0	0	0	<b>2</b>
Total	1	5	9	109	55	11	<b>190</b>	3	8	56	92	23	8	<b>190</b>

Os valores do CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> para colistina em *Salmonella* spp foi de 4 µg/mL e 8 µg/mL respectivamente. Para a polimixina B os valores do CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> foi de 4 µg/mL e 8 µg/mL respectivamente.

Entre os 57 isolados de ExPEC resistentes a colistina no teste da gota, 56 (98%) apresentaram resultado resistente (CIM ≥ 4µg/mL) no teste da CIM. Apenas 3 (5%) isolados apresentaram CIM igual 4µg/mL, 21 (37%) isolados apresentaram CIM igual 8µg/mL e 32 (56%) isolados apresentaram CIM igual 16µg/mL para colistina. Para polimixina B, 18 (32%) isolados apresentaram CIM de 4µg/mL e 33 (58%) isolados apresentaram CIM igual 8 µg/mL e 3 (5%) isolados apresentaram CIM igual 16µg/mL.

Os valores do CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> para colistina em ExPEC foi de 16µg/mL. Para polimixina B os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> foi de 8µg/mL.

### 5.3. Caracterização Genotípica dos mecanismos de resistência a polimixinas

### **5.3.1. Caracterização do gene de resistência antimicrobiana a colistina (*mcr*).**

Das 124 cepas de *Salmonella* resistentes a colistina e polimixina B, apenas um isolado foi positivo para o gene *mcr-1*, e este gene foi detectado em um plasmídeo do grupo *IncX4*. A cepa 2018.466 foi caracterizada como *S. Choleraesuis* proveniente de sangue de origem humana. Este resultado foi publicado em Dos Santos *et al.*, 2020.

Dos 56 isolados de ExPEC resistentes a colistina, 21 (37%) isolados apresentaram o gene *mcr-1*. Este gene foi detectado em plasmídeos do grupo *IncX4* (n=17) e em plasmídeos do grupo *IncF* (n=4). Destes 21 isolados apresentando o gene *mcr-1*, 13 isolados são provenientes de urina de pacientes hospitalizados.

### **5.3.2. Detecção e caracterização dos genes *pmrA/B* e *phoP/Q* em *Salmonella***

As 124 cepas de *Salmonella* spp. resistentes a colistina e polimixina B tiveram os genes *pmrA/B* e *phoP/Q* sequenciados para pesquisa de mutações. Foram detectadas mutações em 44 isolados distribuídos em diferentes sorotipos (Tabela 7). As principais mutações encontradas no gene *pmrA* foram Y25L, A26C, C27V e T89S. No gene *pmrB*, as mutações mais frequentemente encontradas foram H2R, D283G e E123D. Foi identificada apenas uma mutação em PhoP (Q112P). Não foi identificada mutação no gene *phoQ* em *Salmonella* spp.

Dos 44 isolados apresentando mutações, 18 isolados apresentaram mutação apenas em *pmrA*, 14 isolados apresentaram mutações apenas em *pmrB*, 11 isolados apresentaram mutações em ambos os genes *pmrA/B* e um isolado apresentou mutação em *pmrB* e *phoQ*.

Oitenta isolados não apresentaram mutações, sendo que a maioria deles faziam parte do antígeno O do grupo D<sub>1</sub> (O9). Destes, 50 isolados eram do sorotipo Enteritidis, 13 isolados eram *S. Dublin*, 2 isolados eram *S.*

Gallinarum e um isolado de *S. Tyhi*. As demais 14 amostras eram pertencentes aos sorogrupos O4, O7, O8 e O21, não apresentaram mutações nos sistemas *PmrA/B* e *PhoP/Q*.

Do total de 124 amostras resistentes pelo teste da CIM, 33 isolados não eram do grupo D<sub>1</sub> e destes 14 apresentaram mutações em *pmrA/B* e/ou *phoPQ*.

**Tabela 7:** Resultado das mutações encontradas em isolados de *Salmonella*.

Cepa	Sorotipo	Origem	Grupo	<i>PmrA</i>	<i>PmrB</i>	<i>PhoP</i>	<i>PhoQ</i>	Colistina CIM	Polimixina B CIM
2016.001	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	8	4
2016.204	Panama	Humano	O:9(D1)	T89S	L23A, F25V, L27V, I28N, S29Q, T30Y, F31L, W32L, L33V, W34M, H35A	-	-	4	4
2016.207	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	M215C	L23A, F25V, Q26P, I28N, S29Q, T30Y, F31L, W32L, L33V, W34M, H35A	-	-	4	4
2016.213	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	T331A	-	-	8	8
2016.214	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	8	8
2016.215	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	8	8
2016.216	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	8	8
2016.217	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	I18L, G19V, L22C, L23W, V24C, F25S, Q26S	-	-	8	4
2016.218	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	8	8
2016.219	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	L22M	-	-	8	8
2016.220	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	8	4
2016.221	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	Y25L	I21Y, L23A, Q26S	-	-	16	8
2016.222	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	T89S	-	-	-	8	8
2016.260	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	M287W, A288R, V289S, E290K, V291T, E292R	-	-	8	4
2016.261	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	D282T, D284T, A285L, M287W	-	-	8	8
2016.262	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.263	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.264	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.265	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	8	8
2016.266	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	Y25L, A26C, C27V	-	-	-	8	4
2016.267	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	8	4
2016.268	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	Y25L, A26C, C27V	-	-	-	8	8
2016.269	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	8	8
2016.270	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	8	4

2016.271	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.272	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	Y25L,A26C,C27V	-	-	-	4	4
2016.273	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	Y25L,A26C,C27V	-	-	-	4	4
2016.274	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.275	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.299	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.300	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.301	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	E184R,P185T, S186L,T187D,N1 88Q,T189H, L190S, E191G,V192S,H1 93A,I194Y,H195T	-	-	-	4	4
2016.302	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.303	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	Y25L,A26C,C27V	-	-	-	4	4
2016.304	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.306	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.307	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	8	4
2016.308	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	T89S	-	-	-	4	4
2016.309	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.310	Enteritidis	Ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.336	Gallinarum	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.337	Dublin	Animal	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.338	Dublin	Animal	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.339	Dublin	Animal	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.340	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.341	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.401	Miami	Alimento	O:9(D1)	T89S	G73S,V74I,I83V, A111T, P270L	-	-	4	4
2016.406	Miami	Alimento	O:9(D1)	Y25L,A26C,C27V	G73S,V74I,I83V, A111T, P270L	-	-	4	4
2016.408	Miami	Alimento	O:9(D1)	T89S	-	-	-	4	4
2016.415	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	8	4
2016.416	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	8	4
2016.419	Dublin	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.436	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.439	Dublin	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.441	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.445	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.446	Dublin	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.447	Dublin	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2017.012	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	P270L,E271K,G272 E	-	-	4	4
2017.013	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	Y25L,A26C,C27V	-	-	-	4	4
2017.017	Dublin	Humano	O:9(D1)	D8G	-	-	-	8	4
2017.042	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2017.050	Typhi	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2017.051	Dublin	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	8	4
2017.077	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2017.120	Dublin	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4

2017.129	Dublin	Humano	O:9(D1)	T89S	-	-	-	8	4
2017.132	Gallinarum	Alimento	O:9(D1)	-	-	-	-	8	8
2017.141	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	8	4
2017.150	Enteritidis	Animal	O:9(D1)	-	-	-	-	8	4
2017.156	Enteritidis	Animal	O:9(D1)	-	-	-	-	8	8
2017.157	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	8	8
2017.159	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	8	8
2017.165	Dublin	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	8	4
2017.214	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2018.005	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2018.007	Dublin	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2018.008	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	Y268F,G272N,T723 PT276Y, H274Y, I275L,I277P	-	-	4	4
2018.014	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2018.016	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2018.046	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2018.049	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	8	4
2018.126	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	8	8
2018.138	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	8	4
2018.148	Enteritidis	Animal	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2018.215	Javiana	Humano	O:9(D1)	T89S	-	-	-	8	4
2018.282	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	8	4
2018.338	Dublin	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	16	16
2018.434	Dublin	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	16	8
2016.305	Enteritidis	ambiente	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2016.343	Enteritidis	Humano	O:9(D1)	-	-	-	-	4	4
2017.114	Newport	Alimento	O:8(C2- C3)	-	-	-	-	4	4
2017.138	Braenderup	Ambiente	O:7(C1)	C27V,T89S	-	-	-	8	4
2018.365	Oranienburg	Humano	O:7(C1)	-	I18L,G19V,I21F,L22 C,L23W,V24C,F25S ,Q26S	-	-	16	16
2018.463	S.l.6,7:e,h:-	Humano	O:7(C1)	-	-	-	-	8	8
2018.466	Choleraesuis	Humano	O:7(C1)	<b>mcr-1</b>	-	-	-	16	16
2016.238	S.l.4,5,12:i:-	ambiente	O:4(B)	T10H,L11A,L12I, L13I,L16V,I17N,L 18T,A19R,A20R, Q21A,T22N,E23R Y25L,A26C,C27V	I18L,G19V,I21F, L22C,L23W, V24C, F25S,Q26S	-	-	4	4
2016.240	S.l.4,5,12:i:-	ambiente	O:4(B)	C27R,A33Q,Y45I	-	-	-	4	4
2016.348	Saintpaul	Humano	O:4(B)	-	I18L,G19V,I21F,L22 C,L23W,V24C, F25S,Q26S	-	-	4	4

2016.417	S.I.4,5,12:i:-	Humano	O:4(B)	V209G,R210S,G211R,G213W,Y214L,M215,L216A,V217G,A218C,T219H	I279M	-	-	8	4
2016.425	S.I.4,5,12:i:-	Humano	O:4(B)	-	-	-	-	4	4
2017.049	Schwarzengrund	Humano	O:4(B)	-	-	-	-	4	4
2017.122	S.I.4,5,12:i:-	Humano	O:4(B)	-	-	-	-	4	4
2017.125	Brandenburg	Animal	O:4(B)	-	-	-	-	4	4
2017.128	Brandenburg	Animal	O:4(B)	-	-	-	-	4	4
2017.135	Sandiego	Ambiente	O:4(B)	T89S	-	-	-	8	8
2017.139	Sandiego	Ambiente	O:4(B)	-	-	-	-	8	8
2017.160	Heidelberg	Alimento	O:4(B)	-	-	-	-	8	8
2018.207	Heidelberg	Animal	O:4(B)	T89S	-	-	-	8	4
2018.211	Heidelberg	Animal	O:4(B)	-	I18L,G19V,I21F,L22C,L23W,V24C,F25S,Q26S	-	-	8	4
2018.222	Saintpaul	Humano	O:4(B)	T89S	I18L,G19V,I21F,L22C,L23W,V24C,F25S,Q26S	-	-	8	4
2018.290	Heidelberg	Animal	O:4(B)	-	I18L,G19V,I21F,L22C,L23W,V24C,F25S,Q26S	-	-	8	4
2018.291	Schwarzengrund	Animal	O:4(B)	-	I18L,G19V,I21F,L22C,L23W,V24C,F25S,Q26S	-	-	8	4
2018.313	Heidelberg	Animal	O:4(B)	-	-	-	-	8	4
2018.347	Heidelberg	Animal	O:4(B)	-	-	-	-	16	16
2018.348	Heidelberg	Animal	O:4(B)	-	-	-	-	16	16
2018.351	Heidelberg	Animal	O:4(B)	-	I18L,I21F,L22C,L23W,V24C,F25S,Q26S	Q112P	-	16	16
2018.354	Schwarzengrund	Animal	O:4(B)	-	I18L,I21F,L22C,L23W,V24C,F25S,Q26S	-	-	16	8
2017.021	S.I.3,10:-:1)	Humano	O:3,10(E1)	A33R	-	-	-	8	4
2017.223	Minnesota	Alimento	O:21(L)	-	-	-	-	4	4
2018.220	Minnesota	Animal	O:21(L)	T89S	I18L,G19V,I21F,L22C,L23W,V24C,F25S,Q26S	-	-	8	4
2018.182	Cerro	Animal	O:18(K)	T89S	I18L,G19V,I21F,L22C,L23W,V24C,F25S,Q26S	-	-	4	4
2018.260	Rubislaw	Animal	O:11(F)	T89S	I18L,G19V,I21F,L22C,L23W,V24C,F25S,Q26S	-	-	8	4
2018.117	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (Rugosa)	Animal	-	-	I18L,V24C,L22C,F25S,G19V,L23W,Q26S,I21F	-	-	16	16

<sup>1</sup> Concentração inibitória mínima; <sup>2</sup> Colistina; <sup>3</sup> Polimixina B

### 5.3.3. Detecção e caracterização dos genes *pmrA/B* e *phoP/Q* em *E. coli*.

As 56 cepas de ExPEC resistentes a colistina foram sequenciadas para pesquisa de mutação nos genes *pmrA/B* e *phoP/Q*. Foram detectadas diferentes mutações pontuais que podem ser visualizadas na tabela 8.

Para *E.coli* as mutações encontradas em *pmrA* foram T31S, G65V, R92C, G144S e L212I. Para o gene *pmrB* em *E.coli* identificamos diferentes mutações mas as duas principais foram H2R, S78R, C84Y, Q193L, A242T, D283G, Y358N e A360V. Para *phoP* identificamos as mutações I44L, P207A, H212Y e S219F. Para *phoQ* foram identificadas as mutações T84X, K172X, L254M, K267T, L283P, M298T, S299I, E304X e N346K. Três isolados não apresentaram mutações nos genes estudados, porém eram positivos para o gene *mcr-1*.

**Tabela 8:** Descrição das mutações dos genes *pmrA/B* e *phoP/Q* em *E. coli*.

Cepa	Origem	Mutação				Gene	CIM <sup>1</sup>	
		<i>PmrA</i>	<i>PmrB</i>	<i>PhoP</i>	<i>PhoQ</i>		<i>mcr</i>	<i>COL</i> <sup>2</sup>
2016.053	Swab retal		H2R; D283G; A360V	I44L; P207A	-	-	16	16
2016.426	Sangue	G144S	Q193L	I44L; P207A; H212Y; S219F	-	<i>mcr-1+</i>	16	8
2016.816	Secreção	-	-	-	-	<i>mcr-1+</i>	16	8
2016.823	Swab osso	G144S	D283G; Y358N	P207A	-	<i>mcr-1+</i>	16	8
2016.824	Partes moles	G144S	D283G; Y358N	P207A	-	<i>mcr-1+</i>	16	8
2016.825	Urina	-	H2R; D283G; A360V	I44L; P207A	-	<i>mcr-1+</i>	16	8
2016.973	Urina	-	A242T; V351I	I44L	E304X	<i>mcr-1+</i>	16	8
2016.989	Urina	-	-	-	-	<i>mcr-1+</i>	16	8
2017.055	Urina	-	L14P; K215I	-	M298T	-	16	16
2017.073	Swab retal	T31S	H2R; E123D; D283G; V351I	I44L; P207A	T84X	<i>mcr-1+</i>	16	8
2017.125	Urina	T31S; G65V; G144S; L212I	H2R; E123D	I44L; S202T; P207A	-	-	16	16
2017.153	Urina	G144S	D283G; Y358N	I44L; P207A; H212Y; S219F	L283P	<i>mcr-1+</i>	16	8
2017.155	Urina	-	-	-	-	<i>mcr-1+</i>	16	8
2017.156	Urina	G144S	H2R; D283G	I44L; P207A	-	<i>mcr-1+</i>	16	8
2017.157	Urina	G144S	H2R; D283G	I44L; P207A	-	<i>mcr-1+</i>	4	4
2017.173	Urina	T31S; R92C; L212I	H2R; E123D; D283G; V351I	I44L; P207A	T84X	-	8	4
2017.221	Não informado	-	-	-	L283P	-	8	4
2017.231	Urina	-	H2R	-	-	<i>mcr-1+</i>	8	4
2017.244	Sangue	-	D283G; Y358N	I44L; P207A; H212Y; S219F	-	<i>mcr-1+</i>	8	4
2017.253	Lavado broncoalveolar	-	-	I44L; P207A; H212Y; S219F	-	<i>mcr-1+</i>	8	4
2017.262	Urina	L212I	H2R; D283G; A360V	I44L; P207A	N346K	<i>mcr-1+</i>	4	1

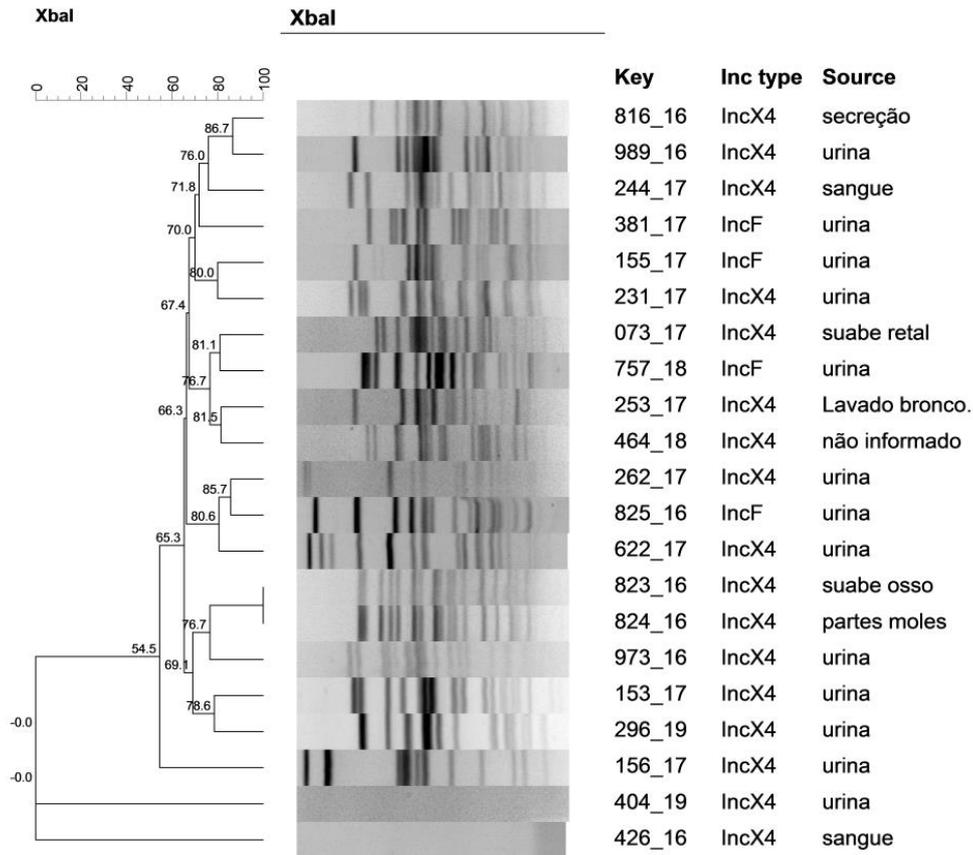
2017.271	Urina	L212I	H2R; S78R	I44L; S202T; P207A	K172X	-	16	8
2017.272	Urina	L212I	H2R; S78R	I44L; S202T; P207A	T84X; K172X	-	16	8
2017.347	Urina	T31S; R92C; L212I	H2R; E123D	I44L; P207A	T84X	-	16	8
2017.348	Urina	T31S; L212I	H2R; P94L; E123D	I44L; P207A	-	-	16	8
2017.367	Urina	T31S; G144S; L212I	H2R; C84Y; E123D	I44L; S202T; P207A	T84X	-	16	8
2017.381	Urina	L212I	H2R; D283G; A360V	P207A	-	<i>mcr-1+</i>	16	8
2017.465	Urina	T31S; G144S; L212I	H2R; E123D; L194P	I44L; S202T; P207A	T84X	-	8	4
2017.528	Urina	L23R; T31S	E123D; P96L	I44L; P207A; H212Y; S219F	-	-	8	4
2017.621	Urina	T31S; L212I	H2R; E123D; G160E	I44L; P207A	T84X	-	8	8
217.622	Urina	L212I	H2R; D283G; A360V	I44L; P207A	-	<i>mcr-1+</i>	8	4
2018.001	Urina	T31S; I128N; G144S; L212I	H2R; E123D	I44L; S202T; P207A	-	-	8	4
2018.027	Urina	L212I	H2R; E121K; S138N	I44L; P207A	S138T	-	16	8
2018.056	Urina	-	H2R; S138N; L145X	I44L; P207A; H212Y; S219F	-	<i>mcr-1+</i>	8	4
2018.075	Urina	T31S; G144S; L212I	H2R; E123D; L194P	I44L; S202T; P207A	T84X; S299I	-	8	4
2018.464	Não informado	T31S; L212I	H2R; E123D; D283G; V351I	I44L; P207A	-	<i>mcr-1+</i>	8	4
2018.477	Urina	G144S	H2R; G19E; D283G	I44L; S202T; P207A	-	<i>mcr-1+</i>	8	4
2018.512	Não informado	L212I	H2R; S138N; A160V	I44L; P207A	S138T	-	16	8
2018.528	Urina	T31S; G144S	H2R	I44L; S202T; P207A	-	-	8	4
2018.545	Não informado	T31S; G144S; L212I	H2R; Q99P; E123D;	S202T; P207A	L26X	-	8	4
2018.571	Não informado	T31S; L212I	H2R; G19R	I44L; P207A	-	-	8	8
2018.579	Não informado	A42T; G155D	H2R; S138N; M229I; T246I; D283G	I44L; P207A; S219L	T84X	-	8	8
2018.689	Urina	T31S; R81C; L212I	H2R; E123D; D283G; V351I	I44L; P207A	T84X	-	8	4
2018.757	Urina	T31S; I1128N; G144S; L212I	H2R; E123D; D283G; V351I	I44L; S202T; P207A	-	<i>mcr-1+</i>	8	8
2018.857	Não informado	T31S; G64S; L212I	H2R; E123D	I44L; P207A	-	-	16	8
2018.867	Urina	T31S; G53S; L212I	H2R; E123D; D283G; V351I	I44L; P207A; S219F	-	-	16	8
2018.890	Urina	L212I	H2R; T156M; D283G; A360V	I44L; S202T; P207A	-	-	16	8
2018.916	Urina	-	H2R; P94L	I44L; P207A; H212Y; S219F	-	-	16	8
2019.030	Urina	G65E; G144S	H2R; D283G	I44L; S202T; P207A	L283P	-	16	8
2019.107	Urina	-	A118T	-	-	-	16	8
2019.221	Urina	L212I	H2R; S138N; D283G	I44L; P207A	S138T	-	16	8
2019.296	Urina	-	D283G	I44L; P207A; H212Y; S219F	-	<i>mcr-1+</i>	16	8
2019.306	Urina	G144S	Q251H	I44L; P207A; H212Y; S219F	-	-	4	2
2019.404	Urina	-	H2R	P207A	-	<i>mcr-1+</i>	16	8
2019.410	Urina	-	-	P207A	L254M; K267T; L283P	-	8	4
2020.214	Líquido peritoneal	L212I	H2R; T156M; T246I; D282X; D283G	I44L; S202T; P207A	-	-	16	8

<sup>1</sup> Concentração inibitória mínima; <sup>2</sup> Colistina; <sup>3</sup> Polimixina B. Popoff MY, 2001,

#### 5.4. Resultado da Técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

A tipagem pela PFGE foi realizada nos isolados onde foi detectada a presença do gene *mcr-1*, com o objetivo de verificar a diversidade genética encontrada entre elas. Como apenas uma amostra de *Salmonella* spp. foi positiva para o gene *mcr-1*, apenas os 21 isolados de *E.coli* foram tipados pelo PFGE.

A macro-restrição do DNA cromossômico obtida com a enzima *XbaI*, e analisada por PFGE das 21 cepas de *E. coli* evidenciou 18 perfis genéticos, com similaridade de 54,5%, sendo que duas cepas foram classificadas como não-tipáveis. A **Erro! Fonte de referência não encontrada.**<sup>6</sup> apresenta o dendrograma de similaridade genotípica gerada a partir da metodologia de PFGE para as cepas de *E. coli* resistentes a colistina e portadores do gene *mcr-1*.



**Figura 6:** Dendrograma obtido pela análise por PFGE dos fragmentos obtidos pela digestão com *XbaI* das cepas de *E.coli* positivas para o gene *mcr-1*. Foi utilizado o coeficiente de Dice com tolerância e otimização de 1,5% e UPGMA (Bionumerics 8.0). Estão indicados: número da amostra\_ano (key), tipo de Inc type plasmidial, e sítio de origem (source).

## **DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

*Salmonella* spp. são reconhecidas como um dos mais importantes patógenos que ocasionam doenças de origem alimentar ao redor do mundo (Dangel *et al.*, 2019). As infecções ocasionadas por *Salmonella*, especialmente nos países em desenvolvimento, é um fardo tanto para a economia quanto para a saúde pública. O uso de antibióticos no tratamento da infecção está se mostrando menos eficaz devido ao aumento alarmante de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos (Jayol *et al.*, 2018). A detecção da multirresistência de diversas bactérias despertou um alerta mundial, pois, a problemática limita as opções de tratamento para as infecções, além de facilitar a transferência de genes de resistência entre outros micro-organismos patogênicos (Iglesias *et al.*, 2017; Jayol *et al.*, 2018).

Outro patógeno bacteriano gram-negativo comumente encontrado em infecções humanas é a *Escherichia coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) (Poolman e Walcker, 2016). ExPEC causa a grande maioria das infecções do trato urinário (ITUs), é uma das principais causas de bacteremia em adultos e é a segunda causa mais comum de meningite neonatal (Russo *et al.*, 2003). O aumento da resistência a múltiplos fármacos entre as cepas de ExPEC constitui um grande obstáculo ao tratamento e está implicado no aumento do número de hospitalizações e mortes e no aumento dos custos de saúde associados às infecções por ExPEC (Poolman e Walcker, 2016).

A resistência antimicrobiana está se tornando um grande desafio para saúde pública devido ao aumento da resistência aos beta-lactâmicos em geral, visto que diversos patógenos codificam  $\beta$ -lactamases que hidrolisam a maioria desses antimicrobianos, principalmente os de espectro estendido (ESBL), como cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> gerações (Bush e Jacoby, 2010; Kao *et al.*, 2017). A colistina (polimixina E) é um antimicrobiano da família de antibióticos polipeptídicos catiônicos que atua como última linha de defesa no tratamento de infecções bacterianas graves por bactérias multi-resistentes (MDR) ou extensivamente fármaco resistente (XDR). Em particular, a colistina é usada para tratar Infecções ocasionadas por bactérias produtoras de ESBL e resistente a carbapenêmicos (Li *et al.*, 2006).

O aumento do número de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases resultou no aumento do uso da colistina em hospitais, com o inevitável risco de resistência emergente (Liu *et al.*, 2016). A prevenção à resistência antimicrobiana ficou mais comprometida pelo uso ativo da colistina em animais de produção (Shen *et al.*, 2020). Até o final de 2015, pensava-se que a resistência adquirida à colistina em *Enterobacteriaceae* era exercida por mecanismos cromossômicos, incluindo modificações de lipopolissacarídeos (LPS), como a adição de 2-aminoetanol, 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) ou fosfoetanolamina (PetN), ou outra estratégia, como bomba de efluxo (Olaitan *et al.*, 2014). Em 2015, Liu e colaboradores identificaram pela primeira vez o gene *mcr-1* (*mobile colistin resistance*), conferindo resistência a polimixinas em *E.coli* isolado de animais para alimentação (porcos e aves) na China.

Neste estudo realizamos uma triagem pelo teste da gota em 1026 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de origem humana e de origem não humana (alimentos, animais e ambiente) isoladas no período de 2016-2018, e 159 cepas de *E. coli* extra-intestinal (ExPEC) isoladas de humanos no período de 2016-2020, que equivalem ao número total de cepas recebidas no laboratório no período estudado.

O teste da gota foi desenvolvido e validado em 2018 (Pasteran *et al.*, 2018, 2021), pelo ANLIS Malbran (*Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud Dr. Carlos G. Malbrán*), na Argentina, como alternativa para melhorar a precisão da triagem de resistência à colistina, uma vez que, este teste era capaz de detectar resistência à colistina mediada por mecanismos de detecção de mutações no cromossomo, e por plasmídeos (*mcr*). Além disso, o teste da gota pode ser realizado na mesma placa em que foram colocados os discos para realizar um antibiograma. Porém, seu uso não é recomendado como método padrão, porque existe uma taxa de erro para eluição de polimixina, provavelmente devido à ligação diferencial às pontas da micropipeta e/ou a um gradiente de difusão distinto ao redor da gota gotejada (Pasteran *et al.*, 2021).

A determinação da CIM por outros métodos, como o teste utilizando fitas com gradiente de concentrações crescentes do antimicrobiano (E-test), ou por equipamentos semiautomáticos foi desencorajada pelo EUCAST e CLSI, e seu desempenho foi questionado (Pasteran *et al.*, 2021). Jayol *et al.*, 2018 verificou que o sistema automatizado não era confiável para a detecção de heterorresistência à colistina em isolados de enterobactérias. Tan e Ng, 2007, também não encontraram uma boa correlação utilizando o sistema automatizado e o uso de fitas de E-test, obtendo resultados que não eram confiáveis para detectar resistência à colistina, e os resultados exigiam confirmação por um método padrão de teste de CIM. Além disso, o método de difusão em disco não é confiável para medidas de resistência à colistina *in vitro* devido ao fato de antimicrobianos de grande peso molecular, como polimixinas, difundirem lentamente em ágar, resultando em pequenas diferenças no tamanho das zonas de inibição entre isolados suscetíveis e não suscetíveis (Chew *et al.*, 2017; Hindler e Humphries, 2013; Landman, Salamera e Quale, 2013; Poirel, Jayol e Nordmann, 2017; Pasteran *et al.*, 2021).

O CLSI recomenda além do teste de microdiluição em caldo, o teste de eluição de disco em caldo (CBDE) e o ágar diluição para colistina e apenas a microdiluição em caldo para polimixina B. Já o BrCast indica apenas a utilização da microdiluição em caldo para ambos os fármacos (CLSI, 2022; BrCast, 2022). Podemos observar que embora o mercado ofereça sistemas automatizados, existem vários desafios para utilização das polimixinas e o padrão ouro continua sendo a microdiluição em caldo.

Como a emergência da resistência a colistina é um fenômeno global recente, a implementação de ferramentas de triagem rápidas e confiáveis para detectar e analisar patógenos resistentes à colistina de modo a adaptar o tratamento do paciente é uma abordagem necessária. Além disso, a heterorresistência à colistina é um fenômeno que é amplamente subestimado (Bardet e Rolain, 2018). Nossos resultados demonstraram que 190 isolados de *Salmonella* spp. (18,5%), foram caracterizados como resistentes a colistina e polimixina B pelo teste da gota. Estes resultados foram posteriormente

submetidos ao método padrão que é a microdiluição em caldo, que confirmou a resistência a ambos os antibióticos em 124 isolados (65%), e entre os 57 isolados de ExPEC resistentes a colistina no teste da gota, 56 (98%) apresentaram resultado resistente (CIM  $\geq$  4 $\mu$ g/mL) no teste da CIM. A eficácia do teste da gota não foi verificada neste estudo, uma vez que, a CIM não foi realizada no número total de cepas estudadas e o método foi utilizado apenas para triagem, porém, nossos resultados mostraram uma eficácia maior que o estudo realizado por Pasteran e colaboradores (2020), que identificaram que 52% dos isolados triados pelo teste da gota foram categorizados como resistentes a colistina utilizando o teste de microdiluição em caldo. Já Conceição-Neto e colaboradores (2020), identificaram 74% de sensibilidade do teste da gota para *K.pneumoniae*, enquanto Jouy e col, 2017, verificaram que 100% dos isolados de *E.coli* resistentes foram identificados pelo teste da gota.

Através dos resultados obtidos do teste de CIM, verificamos que os valores da CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, que representam as concentrações necessárias para inibir 50% e 90% das amostras para colistina em *Salmonella* spp, foram de 4  $\mu$ g/mL e 8  $\mu$ g/mL respectivamente. Os valores da CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> para colistina em ExPEC foi de 16 $\mu$ g/mL. Nossos resultados da CIM foram maiores quando comparados com os resultados da CIM de outros trabalhos realizados no Brasil (Morales *et al.*, 2012; Cunha MPV, 2018), e observamos em nossos isolados que os valores da CIM vem aumentando anualmente. Um estudo realizado no Brasil utilizando isolados de *E.coli* e *Salmonella* de suínos verificaram que o CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> obtido para *E.coli* foi de 0,25  $\mu$ g/mL e 0,5  $\mu$ g/mL enquanto para *Salmonella* foi de 1  $\mu$ g/mL e 8  $\mu$ g/mL (Morales *et al.*, 2012). Outro trabalho realizado em *E.coli* de diferentes fontes de origem identificou CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> de 4 $\mu$ g/mL e 16  $\mu$ g/mL respectivamente (Cunha MPV, 2018). Um estudo realizado em cepas de *Salmonella* de origem humana na China no período de 2014-2018, obteve CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> de 2 $\mu$ g/mL e 8 $\mu$ g/mL, respectivamente (Luo *et al.*, 2020).

Neste trabalho, nosso principal objetivo foi verificar qual mecanismo de resistência presente nos isolados resistentes a polimixinas e, portanto

realizamos o sequenciamento para detecção de mutações nos genes *pmrA/B* e *phoP/Q* e PCR para identificação de determinantes genéticos. Foram identificadas mutações tanto em *pmrA/B* quanto em *phoP/Q*. Em *Salmonella* spp. identificamos 44 isolados apresentando mutações em *pmrA* e *pmrB*. Apenas uma mutação foi identificada em *phoP* e nenhuma mutação no gene *phoQ*. Esses resultados são esperados no gênero *Salmonella*, onde a maioria das mutações encontradas associadas à resistência a colistina são nos genes *pmrA/B* (Sun *et al.*, 2009; Agerson *et al.*, 2012). Mutações encontradas em *pmrA* como T89S e em *pmrB* como G73S, V74I, I83V, A111T descritas em nosso trabalho, já foram descritas na literatura por estarem associadas a resistência a colistina (Antunes *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2020; Sevilla *et al.*, 2021; Matchawe *et al.*, 2022) Um dos achados neste estudo seriam as diversas mutações em *pmrB*, no entanto, a contribuição individual e os efeitos cumulativos dos genes para a resistência à colistina não foram determinados pois seria necessário mais investigações, como testes de complementação ou mutagênese sítio direcionada, além da realização do estudo em isolados sensíveis a colistina.

Outro resultado obtido em nosso estudo foi que dos 80 isolados que eram resistentes e não apresentavam mutação, 50 eram do sorovar Enteritidis e 13 do sorovar Dublin. Estes resultados são preocupantes uma vez que *S. Enteritidis* é o sorotipo de *Salmonella* mais frequentemente relatado em infecções humanas, principalmente associado a surtos de doenças transmitidas por alimentos e doenças gastrointestinais esporádicas comumente relatado em todo o mundo. Este mecanismo de resistência intrínseca à colistina associado ao grupo D<sub>1</sub>, ao qual pertence *S. enterica* sorovar Enteritidis, é atribuível ao epítipo do antígeno somático (O) e foi descrito em 2020 por Ricci e colaboradores. O antígeno O da *Salmonella* do grupo D<sub>1</sub> difere do grupo B, pois possuem tivelose no lugar da abequose como açúcar do ramo lateral. O aumento da suscetibilidade a colistina em *Salmonella* do grupo D também pode ser devido a uma mutação frameshift no gene *rfc*, que codifica a polimerase do antígeno O (Ricci *et al.*, 2020; Fortini *et al.*, 2022). A hipótese é que o truncamento da proteína *Rfc* causado pela

mutação *frameshift* ocasiona uma montagem e polimerização ineficiente das subunidades do antígeno O, resultando em um LPS rugoso e uma membrana celular mais permeável. Este estudo demonstrou que o epítipo do antígeno O, seja devido à montagem ineficiente ou substituição por outro tipo, pode governar o nível de suscetibilidade à colistina em *S. enterica*. Embora os açúcares sejam muito semelhantes em estrutura, diferindo apenas na posição de um grupo hidroxila, essa diferença sutil entre abequose e tivelose pode ser a causa da suscetibilidade reduzida à colistina observada nos diferentes sorotipos. Uma explicação é que a tivelose pode impedir a molécula de colistina de atingir seu alvo, pois o componente LPS da membrana externa bacteriana é o alvo celular inicial das polimixinas (Ricci et al., 2020; Fortini et al., 2022).

Em nosso estudo, dos 33 isolados resistentes a colistina e polimixina B, cujo sorovar não eram do grupo D<sub>1</sub>, 19 isolados apresentaram mutações em *pmrA* e/ou *pmrB*, porém 14 isolados não apresentaram mutações ou genes de resistência plasmidial. Estes resultados demonstram que apesar dos isolados não apresentarem resistência intrínseca associada ao antígeno O, e nem mutações no sistema de dois componentes, outro mecanismo não identificado conferiu resistência a estes isolados. Vale a pena ressaltar que outros genes associados às modificações do lipídio A no LPS, e que estão associados à resistência a colistina não foram incluídos neste estudo, como o gene *mgrB* que codifica uma proteína transmembrana, que regula negativamente o sistema *PhoP/Q*, que também pode desempenhar um papel na resistência à colistina através de modificações das cargas negativas do LPS (Poirel et al., 2015).

Em nosso trabalho, identificamos diferentes mutações nos genes *pmrA/B* e *phoP/Q* de *E. coli* extraintestinal de isolados humanos. Substituições encontradas em *PmrA* (T31S, G144S) em *PmrB* (H2R, A242T, A360V, E123D, D283G, V351L) e em *PhoP* (I44L) tem sido descritas na literatura conferindo o fenótipo de resistência a colistina (Gallardo et al., 2021; Luo et al., 2017 Sato et al., 2018; Wang et al., 2020; Zakaria et al., 2021; Quesada et al., 2015; Delannoy et al., 2017; Kuang et al., 2020; Han et al., 2020). Em

*E.coli* foram observadas diferentes mutações tanto em *phoP* quanto em *phoQ* e neste gênero é observado a descrição de aumento da CIM quando há mutações nestes genes do sistema de dois componentes (Kuang *et al.*, 2020). Estes resultados são importantes, pois estudos do mecanismo de resistência a colistina em *E.coli* de origem humana ainda são escassos em nosso país, uma vez que, grande parte dos estudos são voltados para animais de produção que são considerados os grandes reservatórios da resistência antimicrobiana associada as polimixinas (Shen *et al.*, 2016).

Com a descoberta do gene *mcr-1* em 2015 (Liu *et al.*, 2016), o governo chinês banuiu a utilização de colistina como promotor de crescimento animal em 2017, pois foi verificado que desde a sua descoberta foram relatadas bactérias positivas para este gene em animais, carnes para consumo, humanos, e no meio ambiente ao redor do mundo. Além disso, até o momento, dez variantes de *mcr* foram identificadas (Wang *et al.*, 2020, Hussein *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021). Um estudo realizado por Wang e colaboradores (2020) verificou que em curto prazo, a retirada da colistina da ração animal na China reduziu significativamente a resistência a colistina e a prevalência de *mcr-1* tanto em animais como em homens. No Brasil, o Ministério da Agropecuária, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a instrução normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016, onde proíbe em todo o território nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. Porém, trabalhos indicam que embora o Brasil e a China já tenham banido o uso de colistina na agricultura, a evidência de que o *mcr-1* pode se espalhar em ambientes hospitalares mesmo na ausência do uso de colistina, bem como na comunidade, levanta a possibilidade de que a disseminação do *mcr-1* possa não ser contido por essas proibições (Huang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

Em nosso estudo, além do plasmídeo do grupo *IncX4* encontrado em 17 isolados de EXPEC, e em um isolado de *Salmonella*, também foi tipado em quatro isolados o plasmídeo do grupo *IncF*, que apesar de ter sido pouco Relatado na literatura carreando o gene *mcr*, é um plasmídeo epidêmico

frequentemente associados a dispersão de genes de resistência bacteriana (McGann *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2018; Shafiq *et al.*, 2019). Até o momento, os plasmídeos que abrigam *mcr-1* foram tipados como plasmídeos dos grupos *IncI2*, *IncX4*, *IncHI1*, *IncHI2*, *IncF*, *IncFI*, *IncFII* e *IncP* (McGann *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2017; Lima, Domingues e Silva., 2019). O plasmídeo *IncX4* é difundido em várias espécies como *E. coli*, *S. enterica* e *Klebsiella pneumoniae*, de origens diversificadas que vão desde humanos, animais, até produtos de origem animal em muitos países, como China, Dinamarca, Reino Unido (Doumith *et al.*, 2016; Webb *et al.*, 2016; Falgenhauer *et al.*, 2016; Lima, Domingues e Silva, 2019). É importante lembrar que plasmídeos *IncX4* portadores de *mcr-1* podem ocorrer em isolados que produzem ESBL e em *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases apresentando ameaça à saúde pública (Yu *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Sekyere, 2018).

Entre os países com isolados de *S. enterica* produtores de *mcr*, a China é o mais frequente, em seguida, os países da Europa abrigaram uma grande diversidade de variantes de *mcr* isolados de origem animal e humano (Portes *et al.*, 2022). Nas Américas, o Brasil apresenta a maior frequência, seguido pela Colômbia, Canadá e Estados Unidos (Portes *et al.*, 2022). Entre mais de 2.600 sorotipos de *Salmonella*, *S. Typhimurium* foi o sorovar frequentemente associado por carrear os genes *mcr* (Nang *et al.*, 2019; Portes *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022)

No Brasil, encontramos *E. coli* isolada de água de córrego nas imediações urbanas albergando o gene *mcr-1* em associação com genes de beta-lactamases *bla<sub>CTX-M-2</sub>* e *bla<sub>CMY-2</sub>* (Furlan *et al.*, 2021), *E.coli* carreando *mcr-1* recuperada de águas costeiras turísticas no Nordeste do país (Cordeiro-Moura *et al.*, 2022), além de *E. coli* isolada de aves carreando *mcr-1* (Barbieri *et al.*, 2021; Chiba *et al.*, 2019). Em *S. enterica* no Brasil, o gene *mcr-1* foi identificado em alimentos (Rau *et al.*, 2018; Rau *et al.*, 2020), em suínos (Vilela *et al.*, 2022), em carne de aves (Moreno *et al.*, 2019) e causando infecções no homem (Dos Santos *et al.*, 2020).

Em nosso trabalho, verificamos que ainda é raro o gene *mcr-1* em *Salmonella*, porém em ExPEC, o gene foi identificado em 21 isolados, que é um resultado alarmante, uma vez que, o gene *mcr* é comumente identificado em *E.coli* isolado de animais e ambiente (Shen *et al.*, 2016). No caso de isolados humanos, a ExPEC é comumente encontrada em infecções do trato urinário e portanto, vem sendo encontrada maior proporção de *mcr-1* neste tipo de isolados (Wu *et al.*, 2021) Além disso, estudos demonstram que é possível a transmissão de *E. coli* carregando *mcr-1* entre animais de companhia e humanos (Zhang *et al.*, 2016).

A tipagem pela PFGE foi realizada nos isolados de *E.coli* positivos para o gene *mcr-1*, com o objetivo de verificar a diversidade genética encontrada entre elas e evidenciou 18 perfis genéticos, com porcentagem de similaridade de 54,5% entre os isolados. Podemos observar que as amostras de *E.coli* isoladas de humano, revelaram diferentes pulsotipos, sem nenhum clone principal. Estes resultados obtidos em ExPEC é preocupante pois a disseminação das variantes de *mcr* é de grande preocupação para a segurança alimentar e saúde pública, e é urgente aumentar a vigilância e controlar a disseminação de genes *mcr*, pois vem se notando um aumento significativo de detecção. Estudos demonstram que isolados de *E. coli* produtores de *mcr-1* de aves aumentaram de 5,2% em 2009 para 30% em 2014 na China (Shen *et al.*, 2016). Em outro estudo retrospectivo da China, o primeiro isolado de *E. coli* produtor de *mcr-1* de ave foi encontrado na década de 1980, o que correspondeu ao início do uso de colistina na pecuária como aditivo alimentar (Shen *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2022) e estudos vem observando que o gene já circulava em *Salmonella* 4,[5],12 :- isolado de humano em 2001 (*mcr-9*) nos Estados Unidos (Zhang *et al.*, 2022). Outros estudos ainda apontam que o gene *mcr* pode estar contribuindo para uma disseminação silenciosa, uma vez que a variante *mcr-9* não ocasiona o fenótipo de resistência em alguns hospedeiros, mas esta variante está em plasmídeos epidêmicos que podem potencialmente ser transferidos para outros patógenos (Kieffer *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021).

## **CONCLUSÃO**

## 7. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou a pequena participação de genes de origem plasmidial mediando a resistência a polimixina em isolados de *Salmonella* de origem humana e não humana que circulam em nosso país. Por outro lado, mostrou que em ExPEC a prevalência destes genes é maior, associada a plasmídeos do tipo IncX4 presentes em diferentes perfis genéticos (PFGE). Foram encontradas as mutações clássicas descritas na literatura associadas a resistência a polimixinas em ambos os gêneros. Este estudo confirma a necessidade de levantamentos epidemiológicos prospectivos, uma vez que o conhecimento atual ainda é escasso em nosso país, e estudos demonstram que a distribuição de *mcr* pode estar subestimada. É necessário monitorar os mecanismos de resistência a colistina para permitir estratégias eficazes de controle, uma vez que ela é um dos antimicrobianos de último recurso para tratamento de infecção bacteriana e a resistência a este fármaco tornou-se um grave problema de saúde pública.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta RS. 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 2016; 66: 5575–5599.

Andrews JR, Ryan ET. Diagnostics for invasive *Salmonella* infections: Current challenges and future directions. Vaccine 2015;33: C8-C15.

Antunes P, Campos J, Mourão J, Pereira J, Novais C, Peixe L. Inflow water is a major source of trout farming contamination with *Salmonella* and multidrug resistant bacteria. Sci Total Environ 2018; 642: 1163-1171.

Antunes P, Mourão J, Campos J, Peixe L. Salmonellosis: the role of poultry meat. Clin Microbiol Infect 2016; 22(2):110-121.

Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 23: Incidentes Relacionados à Assistência à Saúde - 2019 [internet]. Anvisa: 2019 [cited 2022 Mar 8]. Available from: [https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/boletim\\_2019.pdf](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/boletim_2019.pdf)

Bai L, Hurley D, Li J, Meng Q, Wang J, Fanning S, et al. Characterization of multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* cultured from pigs in China: co-occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and *mcr-1*-encoding genes on plasmids. Int J Antimicrob Agents 2016; 48: 445-448.

Barbieri NL, Pimenta RL, Melo DA, Nolan LK, Souza MMS, Logue CM. *mcr-1* Identified in Fecal *Escherichia coli* and Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) From Brazil. Front. Microbiol., 2021; 12: 1-15.

Bardet L, Rolain JM. Development of New Tools to Detect Colistin-Resistance among Enterobacteriaceae Strains. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2018; 2018:1-25.

Bartoloni A, Pallecchi L, Riccobono E, Mantella A, Magnelli D, Di Maggio T, et al. Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli*: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America. Clin Microbiol Infect 2013;19:356–361.

Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJA. General Method for Detecting and Sizing Large Plasmids. *Anal Biochem.* 1995; 226:235–240.

Biedenbach DJ, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Analysis of *Salmonella* spp with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54:13–21.

Binsker U, Käsbohrer A, Hammerl JA. Global colistin use: a review of the emergence of resistant Enterobacterales and the impact on their genetic basis. *FEMS Microbiol Rev* 2022; 46(1): 1-37.

Bonten M, Johnson JR, Biggelaar AHJ, Georgalis L, Geurtsen J, Palacios PI, et al. Epidemiology of *Escherichia coli* Bacteremia: A Systematic Literature. *Clin Infect Dis* 2021; 72: 1211–1219.

BrCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Controle de Qualidade de Rotina e Controle de Qualidade Interno para Determinação da CIM e Disco-Difusão Conforme Recomendação do EUCAST [internet]. Br-CAST 2017 [cited 2022 Mar 8]. Available from: <https://brcast.org.br/>

Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010; 54(3):969-76.

Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall J. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; 63:219–228.

Castanheira M, Griffin MA, Deshpande LM, Mendes RE, Jones RN, Flamm RK. Detection of *mcr-1* among *Escherichia coli* Clinical Isolates Collected Worldwide as Part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in 2014 and 2015. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 5623-5624.

Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K, Holm A, Jukes A, Liebana E, Navas AL, Mackay D, Magiorakos AP, Moulin MAM, Madero CM, Pomba MCMF, Powell M, Pyörälä S, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Törneke K, Duijkeren E, Edo JT. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int J Antimicrob Agents*; 46(3):297-306.

CDC PULSENET. Center for Disease Control and Prevention. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157: H7 *Escherichia coli* non-O157 (STEC) *Salmonella* serotypes *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. CDC: 2017; 157PNL05:1–16.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Catheter-associated Urinary Tract Infections (CAUTI). CDC: 2015 [cited 2022 Jul 20]. Available from:

<https://www.cdc.gov/hai/caUTI/uti.html#:~:text=UTIs%20are%20the%20most%20common%20of%20the%20urethra%20to%20drain%20urine>

Chew KL, La M, Lin RTP, Teoa JWP. Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and mcr-Positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with Broth Microdilution. *J Clin Microbiol* 2017; 55: 2609–2616.

Chiba N, Tanimoto K, Hisatsune J, Sugai M, Shibayama K, Watanabe H, et al. Detection of MCR-1-mediated colistin resistance in *E. coli* isolate from imported chicken meat from Brazil. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019; 16:249–250.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30 ed. M100, 2020.

Conceição-Neto OC, Aires CAM, Pereira NF, Silva LHJ, Picão RC, Siqueira BN, et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical *KPC-2-producing Escherichia coli* isolates in Brazil. *J Antimicrob Agents* 2017; 50: 282-284.

Cordeiro-Moura JR, Kraychete GB, Longo LGA, Corrêa LL, Silva NMV, Campana EH, et al. 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* 2022; 97: 105196.

Cunha MPV. Determinantes Emergentes de Resistência Antimicrobiana em *Escherichia coli* de Origem Clínica, Fecal e de Carne de Aves e Suínos. [Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 2018.

Daza-Cardona EA, Buenhombre J, Fontenelle ROS, Barbosa FCB. *mcr-mediated* colistin resistance in South America a One Health approach: a review. *Rev Med Microbiol* 2022; 33: 119-136.

Development and validation of simple tests (agar spot, colistin drop, 1ml-broth disk elution CIM and tablet pre-diffusion) as an alternative to improve accuracy in screening chromosomal and plasmid-mediated colistin resistance in GNB. F. Pasteran, D. Danze, C. Cabrera, C. Lucero, A. Menocal, E. Albornoz, I. Castillo, M. Rapoport, P. Ceriana, P. Gagetti, A. Corso. O0952. 28<sup>o</sup> ECCMID, 2018.

Dobiasova H, Dolejska M. Prevalence and diversity of *IncX* plasmids carrying fluoroquinolone and  $\beta$ -lactam resistance genes in *Escherichia coli* originating from diverse sources and geographical areas. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 2118–2124.

Dos Santos C, Cunha MP, Bertani A, Almeida E, Gonçalves C, Sacchi C, et al. Detection of multidrug- and colistin-resistant *Salmonella Choleraesuis* causing bloodstream infection. *J Antimicrob Chemother* 2020; 75:2009-2010.

- Doumith M, Godbole G, Ashton P, Larkin L, Dallman T, Day M, et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71(8):2300-5.
- Ethica SN, Fuad H, Hidayah N, Dewi SS, Ernanto AR, Sulistyaningtyas AR, et al. Detection of virulence genes *phoP* AND *phoQ* in *Salmonella* spp. Using in silico polymerase chain reaction. *Research Fair Unisri.* 2019; 4:340-349.
- Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clin Infect Dis.* 2005; 40:1333–1341.
- Falgenhauer L, Waezsada SE, Yao Y, Imirzalioglu C, Käsbohrer A, Roesler U, et al. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(3):282-3.
- Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA, Moura Q, Pérez-Chaparro PJ, Esposito F, et al. First Report of the Globally Disseminated *IncX4* Plasmid Carrying the *mcr-1* Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a Human Infection in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60: 6415–6417.
- Fernandes SA, Camargo CH, Francisco GR, Bueno MFC, Garcia DO, Doi Y, et al. Prevalence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases CTX-M-8 and CTX-M-2-Producing *Salmonella* Serotypes from Clinical and Nonhuman Isolates in Brazil. *Microb Drug Resist.* 2017; 23: 580–589, 2017.
- Focaccia R, Moraes AS, Ribeiro MLA, Carbonari KFBSF, Quevedo BS. Bloodstream infection by *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* in a cancer patient in southern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2018; 22: 355-357.
- Fuga B, Sellera FP, Cerdeira L, Esposito F, Cardoso B, Fontana H, et al. WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: GenoCIMS Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. *Microbiol Spectr* 2022; 10: 1-18.
- Furlan JPR, Lopes R, Stehling EG. Multidrug resistance *IncC* plasmid carrying *bla*CMY-97 in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* ST215-H54 of ovine origin. *Infection, Genetics and Evolution*, 2021; 93:1-7.
- Gallardo A, Iglesias M, Ugarte-Ruiz M, Hernández M, Miguela-Villoldo P, Gutiérrez G, et al. The Plasmid-Mediated *Kluyvera*-Like *arnBCADTEF* Operon Confers Colistin (Hetero)Resistance to *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2021; 65: 1-12.
- Geitani R, Moubareck CA, Touqui L, Sarkis DK. Peptídeos antimicrobianos catiônicos: alternativas e / ou adjuvantes aos antibióticos ativos contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. *BMC Microbiol* 2019; 19: 1-12.

Girardello R, Gales AC. Resistência às Polimixinas: velhos antibióticos últimas opções terapêuticas. Rev Epidemiol e Controle de Infecção 2012; 2:66.

Girardello R, Piroupo CM, Martins Jr J, Maffucci MH, Cury AP, Franco MRG, et al. Genomic Characterization of *mcr-1.1*-Producing *Escherichia coli* Recovered From Human Infections in São Paulo Brazil. Front Microbiol. 2021; 12: 1-9.

Gogry FA, Siddiqui MT, Sultan I, Haq QMR. Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. Front Med. 2021; 8:1-19.

Goto R, Miki T, Nakamura N, Fujimoto M, Okada N. *Salmonella* Typhimurium PagP- and UgtL-dependent resistance to antimicrobial peptides contributes to the gut colonization. PLoS One 2017; 12: 1-14.

Han S, Kim JS, Hong CK, Park SH, Kim LS, Yu JK, et al. Identification of an extensively drug-resistant *Escherichia coli* clinical strain harboring *mcr-1* and *bla*NDM-1 in Korea. J Antibiot (Tokyo) 2020; 73: 852-858.

Hancock SJ, Phan MD, Peters KM, Forde BM, Chong TM, Yin WF, et al. Identification of IncA/C Plasmid Replication and Maintenance Genes and Development of a Plasmid Multilocus Sequence Typing Scheme. J Antimicrob Chemother 2017; 61:1-17.

Hindler JA, Humphries RM. Colistin CIM Variability by Method for Contemporary Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. J Clin Microbiol 2013; 51: 1678–1684.

Huang J, Li C, Song J, Velkov T, Wang L, Zhu Y, et al. Regulating polymyxin resistance in Gram-negative bacteria: roles of two-component systems *PhoPQ* and *PmrAB*. Future Microbiol. 2020; 15: 445-459.

Hussein NH, Al-Kadmy IMS, Taha BM, Hussein JD. Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. Mol Biol Rep. 2021; 48(3):2897-2907.

Iglesias MA, Kroning IS, Decol LT, Franco BDGM, Silva WP. Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. Food Res Int. 2017; 100:96-101.

Irrgang A, Roschanski N, Tenhagen B, Grobbel M, Skladnikiewicz-Ziemer T, Thomas K, et al. Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from Livestock and Food in Germany 2010–2015. PLoS ONE 2016;11:1-10.

Jayol A, et al. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the *PhoPQ* regulatory system. J Clin Microbiol 2015; 59:2780–2784.

Jeong HS, Kim JA, Shin JH, Chang CL, Jeong J, Cho J, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and mutations in the gyrase and

- topoisomerase IV genes in *Salmonella* isolated from 12 tertiary-care hospitals in Korea. *Microb Drug Resist*. 2011; 17: 551–557.
- Johnson TJ, Bielak EM, Fortini D, Hansen LH, Hasman H, Debroy C, et al. Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae. *Plasmid*. 2012; 68: 43–50.
- Kao D, Roach B, Silva M, Beck P, Rioux K, Kaplan GG, et al. Effect of Oral Capsule- vs Colonoscopy-Delivered Fecal Microbiota Transplantation on Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2017; 318(20):1985-1993.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2(2):123-40.
- Kempf AJ, Hulsebus HJ, Akbar S. Multiple Plasmids Contribute to Antibiotic Resistance and Macrophage Survival In Vitro in CMY2-Bearing *Salmonella enterica*. *Foodborne Pathog Dis*. 2016; 13(7):398-404.
- Kieffer N, Royer G, Decousser JW, Bourrel AS, Palmieri M, Rosa JMO, et al. *mcr-9*, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in *Escherichia coli*, and Its Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2019; 63 (9): 1-11.
- Kim S, Woo JH, Kim N, Kim MH, Kim SY, Son Jhet al. Characterization Of Chromosome-Mediated Colistin Resistance In *Escherichia coli* Isolates From Livestock In Korea. *Infect Drug Resist* 2019; 12: 3291–3299.
- Köhler CD, Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med Microbiol* 2011; 308: 642-7.
- Kuang Q, He D, Sun H, Hu H, Li F, Li W, et al. R93P Substitution in the PmrB HAMP Domain Contributes to Colistin Heteroresistance in *Escherichia coli* Isolates from Swine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020; 64: 1-9.
- Landman D, Salamera J, Quale J. Irreproducible and Uninterpretable Polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 4106–4111.
- Leite EL, Araújo WJ, Vieira TR, Zenato KS, Vasconcelos PC, Cibulski S, et al. First reported genome of an *mcr-9*-mediated colistin-resistant *Salmonella* Typhimurium isolate from Brazilian livestock. *J Glob Antimicrob Resist* 2020; 23: 394-397.
- Li R, Xie M, Zhang J, Yang Z, Liu Z, Liu X, et al. Genetic characterization of *mcr-1* bearing plasmids to depict molecular mechanisms underlying dissemination of the colistin resistance determinant. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72: 393–401.
- Lima T, Domingues S, Silva JJ. Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. *Microorganisms* 2019; 7(55): 1-17.

- Ling Z, Yin W, Shen W, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. J Antimicrob Chemother 2020; 75:1-9.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi L, Zhang R, Spencer J, et al. 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 2016; 16(2): 161–168.
- Lorenzoni VV, Dalmolin TV, Franco LN, Barth AL, Hörner R. Bloodstream infection by *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* in a cancer patient in southern Brazil. Braz J Infect Dis. 2018; 22:356-357.
- Luo Q, Wang Y, Fu H, Yu X, Zheng X, Chen Y, et al. Serotype Is Associated With High Rate of Colistin Resistance Among Clinical Isolates of *Salmonella*. Microbiol Frontal 2020; 11: 1-8.
- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clin Infect Dis 2010; 50(6):882-9.
- Matchawe C, Machuka EM, Kyallo M, Bonny P, Nkeunen G, Njaci I, et al. Detection of Antimicrobial Resistance, Pathogenicity, and Virulence Potentials of Non-Typhoidal *Salmonella* Isolates at the Yaounde Abattoir Using Whole-Genome Sequencing Technique. Pathogens 2022; 11: 1-17.
- McGann P, Snesrud E, Maybank R, Corey B, Ong AC, Clifford R, et al. *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *blaCTX-M* on a Novel *IncF* Plasmid: First Report of *mcr-1* in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2016; 60: 4420–4421.
- Melo RT, Galvão NN, Guidotti-Takeuchi M, Peres PABM, Fonseca BB, Profeta R, et al. Molecular Characterization and Survive Abilities of *Salmonella* Heidelberg Strains of Poultry Origin in Brazil. Front Microbiol <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.674147> 2021
- Mendes CAC, Burdmann EA. Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. Rev. Assoc. Med. Bras. 2009; 55: 752–9.
- Mendes-Oliveira VR, Paiva MC, Lima WG. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review. Travel Med Infect Dis 2019; 31:101459.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*. Brasília, 2011.
- Monsieurs P, Keersmaecker S, Navarre WW, Bader MW, Smet F, McClelland M, et al. Comparison of the PhoPQ Regulon in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J Mol Evol 2005; 60: 462-74.
- Moreno LZ, Gomes VTM, Moreira J, Oliveira CH, Peres BP, Silva AP, et al. First report of *mcr-1*-harboring *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund

isolated from poultry meat in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2019; 93 (4): 376-379.

Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, et al. *PmrB* Mutations Promote Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Colistin-Treated Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 1019-1030.

Mutai WC, Waiyaki PG, Kariuki S, Muigai AWT. Plasmid profiling and incompatibility grouping of multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates in Nairobi Kenya. *BMC Res Notes* 2019; 12: 4–9.

Neto LVP, Corscadden L, Martins RCR, Nagano DS, Cunha MPV, Neves PR, et al. Simultaneous colonization by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* harboring *mcr-1* in Brazil. *Infection* 2019; 47:661-669.

Nishino Y, Shimojima Y, Suzuki Y, Ida M, Fukui R, Kuroda S, et al. Detection of the *mcr-1* gene in colistin-resistant *Escherichia coli* from retail meat in Japan. *Microbiol Immunol* 2017; 61: 554-557.

O'Neill J. Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. *Drug Resist Updat*, 2015.

O'Neill J. Book review: Tackling drug-resistant infections globally: Final Report and Recommendations. *Arch Pharm Pract.* 2016; 7(3): 110.

Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* 2014; 5:1–18.

Oliveira FA, Zaccariotto TR, Piveta C, Hofling CC, Resende MR, Levy CE, et al. *MCR-1*-positive colistin-resistant *Escherichia coli* in immunocompromised hospitalised patients. *J Antimicrob Agents* 2018; 52: 438-440.

Oliveira VRM, Paiva MC, Lima WG. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbea: A systematic review. *Travel Med Infect Dis* 2019; 31:1-9.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Américas notificam aumento de infecções resistentes a medicamentos devido ao uso indevido de antimicrobianos durante pandemia [internet]. [cited 2022 Mar 08]. Available from: <https://www.paho.org/pt/noticias/17-11-2021-americas-notificam-aumento-infeccoes-resistentes-medicamentos-devido-ao-uso>

Paiva Y, Nagano DS, Cotia ALF, Guimarães T, Martins RCR, Neto LVP, et al. Colistin-resistant *Escherichia coli* belonging to different sequence types: genetic characterization of isolates responsible for colonization community- and healthcare-acquired infections. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2021; 63: 1-6.

Pasteran F, Danze D, Menocal A, Cabrera C, Castillo I, Albornoz E, et al. Simple Phenotypic Tests To Improve Accuracy in Screening Chromosomal and Plasmid-Mediated Colistin Resistance in Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol* 2021; 59: 1-9.

Perez JC, Groisman EA. Acid pH activation of the *PmrA/PmrB* two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 2007; 63: 283-293.

Pillonetto M, Mazzetti A, Becker GN, Siebra CA, Arend LNVS, Barth AL. Low level of polymyxin resistance among nonclonal *mcr-1*-positive *Escherichia coli* from human sources in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018; 93:140–142.

Poirel L, Jayol A, Nordmanna P. Polymyxins: Antibacterial activity susceptibility testing and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev* 2017; 30: 557–596.

Poolman JT, Wacker M. 0020 Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field. *J Infect Dis*. 2016; 213(1): 6–13.

Popoff MY. Guidelines for the preparation of *Salmonella* antisera. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, 2001.

Portes AB, Rodrigues G, Leitão MP, Ferrari R, Junior CAC, Panzenhagen P. Global distribution of plasmid-mediated colistin resistance *mcr* gene in *Salmonella*: A systematic review. *J Appl Microbiol*. 2022;132:872–889.

Portes AB, Rodrigues G, Leitão MP, Ferrari R, Junior CAC, Panzenhagen P. Global distribution of plasmid-mediated colistin resistance *mcr* gene in *Salmonella*: A systematic review. *J Appl Microbiol*. 2022;132:872–889.

Quesada A, *et al.* Detection of plasmid mediated colistin resistance (*mcr-1*) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. *Res Vet Sci*. 2016; 105:134–135.

Rau RB, Lima-Morales D, Wink PL, Ribeiro AR, Barth AL. *Salmonella enterica mcr-1* Positive from Food in Brazil: Detection and Characterization. *Foodborne Pathog Dis* 2020; 17:202-208.

Rau RB, Lima-Morales D, Wink PL, Ribeiro AR, Martins AF, Barth AL. Emergence of *mcr-1* Producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from Retail Meat: First Detection in Brazil. *Foodborne Pathog Dis* DOI: 101089/fpd20172346, 2017.

Ricci V, Zhang D, Teale C, Piddock LJV. The O-Antigen Epitope Governs Susceptibility to Colistin in *Salmonella enterica*. *mBio* 2020; 11: 1-10.

Rocha IV, Neves CA, Campos ATL, Rezende AM, Leal NC, Vidal CFL, *et al.* Ciprofloxacin-resistant and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* ST410 strain carrying the *mcr-1* gene associated with bloodstream infection. *J Antimicrob Agents* 2017; 49: 655-656.

Rodríguez-Santiago J, Cornejo-Juárez P, Silva-Sánchez J, Garza-Ramosa U. Polymyxin resistance in Enterobacterales: overview and epidemiology in

the Americas. *J Antimicrob Agents*. 2021; 58: DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106426> .

Rolain JM, Olaitan AO. Plasmid-mediated colistin resistance: the final blow to colistin?. *J Antimicrob Agents*. 2016; 47: 4–5.

Rossi F, Girardello R, Morais C, Cury AP, Martins AF, Silva AM, et al. Plasmid-mediated *mcr-1* in carbapenem-susceptible *Escherichia coli* ST156 causing a blood infection: an unnoticeable spread of colistin resistance in Brazil?. *Clinics* 72: <https://doi.org/106061/clinics/2017>, 2017.

Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fisher J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73(5): 1121–1137.

Russo TA, Johnson JR. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 2000; 181: 1753–1754.

Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 2000; 181(5):1753-4.

Sato T, Shiraishi T, Hiyama Y, Honda H, Shinagawa H, Usui M, et al. Contribution of Novel Amino Acid Alterations in PmrA or PmrB to Colistin Resistance in *mcr*-Negative *Escherichia coli* Clinical Isolates, Including Major Multidrug-Resistant Lineages O25b:H4-ST131-H30Rx and Non-x. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 62: 1-11.

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(1):7-15.

Schwarz S, Johnson AP. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 2066–2070.

Sekyere JO, Govinden U, Bester LA, Essack SY. Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods. *J Applied Microbiology* 2016; 121:601-617.

Sevilla E, Vico JP, Delgado-Blas JF, González-Zorn B, Marín CM, Uruén C, et al. Resistance to colistin and production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC enzymes in *Salmonella* isolates collected from healthy pigs in Northwest Spain in two periods: 2008–2009 and 2018. *Int J Food Microbiol* 2021; 338: 1-7.

Shafiq M, Huang J, Rahman SU, Shah JM, Chen L, Gao Y, et al. High incidence of multidrug-resistant *Escherichia coli* coharboring *mcr-1* and *blaCTX-M-15* recovered from pigs. *Infect Drug Resist*. 2019; 12: 2135–2149.

Shafiq M, Huang J, Rahman SU, Shah JM, Chen L, Gao Y et al. High incidence of multidrug-resistant *Escherichia coli* coharboring *mcr-1* and *blaCTX-M-15* recovered from pigs. *Infect Drug Resist*. 2019; 12: 2135–2149.

Shane AL, Mody RK, Crump JA, Tar PI, Steiner TS, Kotloff K, et al. IDSA Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. *Clin Infect Dis*. 2017; 65:1963–73.

Shankar PR. Book review: Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Drug Resist Updat*. 2016; 7: 110.

Sheng W, Wang J, Li S, Lin Y, Cheng A, Chen Y, et al. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities and synergistic activities of antimicrobial combinations against carbapenem-resistant *Acinetobacter* species: *Acinetobacter baumannii* versus *Acinetobacter* genospecies 3 and 13TU. *Drug Resist Updat* 2011; 70 (3): 380-6.

Souza CO, et al. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2016; 2(7): 1–2.

Srinivas P, Rivard K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. *Curr Infect Dis Rep*. 2017; 19(38):1-9.

Strepis N, Voor In 'T, Holt AF, Vos MC, Zandijk WHA, Heikema AP, et al. Genetic Analysis of *mcr-1*-Carrying Plasmids From Gram-Negative Bacteria in a Dutch Tertiary Care Hospital: Evidence for Inpatient and Interspecies Transmission Events. *Front Microbiol*. 2021; 12: 1-11.

Sun J, Zhang H, Liu Y, Feng Y. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol* 2018; 26: 794–808.

Sun J, Fang LX, Wu Z, Deng H, Yang RS, Li XP, et al. Genetic Analysis of the IncX4 Plasmids: Implications for a Unique Pattern in the *mcr-1*. *Acquisition Scientific reports*. 2017; 7: 424.

Sun S, et al. Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother* 2009; 53: 2298–305.

Thet KT, Lunha K, Srisrattakarn A, Lulitanond A, Tavichakorntrakool R, Kuwatjanakul W, et al. Colistin heteroresistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from a Thai university hospital. *World J Microbiol Biotechnol* 2020; 36: 1-7.

Tiba-Casas MR, Camargo CH, Soares FB, Doi Y, Fernandes SA. Emergence of CMY-2-producing *Salmonella* Heidelberg associated with INc11 plasmids isolated from poultry in Brazil. *Microb Drug Resist*. 2019; 25: 271–276.

Toninia MA, Batista JSJL, Freitas LB, Borghi M, Almeida MS, Spano LC, et al. Carbapenem-susceptible *Escherichia coli* ST3901 carrying *mcr-1* and *blaCTX-M* genes isolated from a diabetic foot infection in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018; 13: 209- 210.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia* 12 ed. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: Artmed, 2017.

Trabulsi LB, Alterthum F. Microbiologia. 6 ed. Rio de Janeiro RJ: Atheneu, 2008.

Tsuji BT, Pogue JM, Zavascki AP, Paul M, Daikos GL, Forrest A, et al. 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* 2019; 39(1):10-39.

Vilela FP, Rodrigues DP, Ferreira JC, Darini ALC, Allard MW, Falcão JP. Genomic characterization of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis from Brazil reveals a swine gallbladder isolate harboring colistin resistance gene *mcr-1.1*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2022; 53:1799–1806.

Vincent C, Boerlin P, Daignault D, Dozois CM, Dutil L, Galanakis C, et al. Food Reservoir for *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 88–95.

Walsh TR, Wu Y. China bans colistin as a feed additive for animals. *The Lancet Infectious Diseases* 2016; 16(10):1102-1103.

Wang CH, Siu LK, Chang FY, Chiu SK, Lin JC. A Resistance Mechanism in Non-*mcr* Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Taiwan: R81H Substitution in *PmrA* Is an Independent Factor Contributing to Colistin Resistance. *Microbiol Spectr*. 2021b; 9: 1-9.

Wang Q, Sun J, Li J, Ding Y, Li X, Lin J, et al. Expanding landscapes of the diversified *mcr-1*-bearing plasmid reservoirs. *Microbiome*. 2017; 5 (70): 1-9.

Wanga C, Feng Y, Liuc L, Weid L, Kange M, Zong M. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes e Infec*. 2020; 9:508-516.

Webb HE, Granier SA, Marault M, Millemann Y, Bakker HC, Nightingale KK, et al. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *The Lancet* 2016; 16(2): 144-145.

WHO. World Health Organization. *E coli* [internet]. [cited 2021a Oct 7]. Available from < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> >

WHO. World Health Organization. *Salmonella (não tifóide)* [internet]. [cited 2021b Oct 7]. Available from < [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)) >

Wise MG, Estabrook MA, Sahm DF, Stone GG, Kazmierczak KK. Prevalence of *mcr*-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. *PLOS ONE*. 2018.1-8.

Xu T, Zhang C, Ji Y, Song J, Liu Y, Guo Y, et al. Identification of *mcr-10* carried by self-transmissible plasmids and chromosome in *Enterobacter*

*roggenkampii* strains isolated from hospital sewage water. *Environ Pollut.* 2021; 268:1157-1106.

Yang F, Shen C, Zheng X, Liu Y, Ahmed MAEE, Zhao Z, et al. Plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from market retail fruits in Guangzhou China. *Infect Drug Resist.* 2019; 12: 385–389.

Yuan Y, Li Y, Wang G, Li C, Xiang L, She J, et al. Coproduction Of *mcr-9* And *NDM-1* By Colistin-Resistant *Enterobacter hormaechei* Isolated from Bloodstream Infection. *Infect Drug Resist.* 2019; 12: 2979–2985.

Zakaria AS, Edward EA, Mohamed NM. GenoCIMInsights into a Colistin-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Strain of O23:H4-ST641 Lineage Harboring *mcr-1.1* on a Conjugative IncHI2 Plasmid from Egypt. *Microorganisms.* 2021; 9 (4):1-14.

Zamparette CP, Schorner M, Campos E, Moura Q, Cerdeira L, Tartari DC, et al. *IncX4* Plasmid-Mediated *mcr-11* in Polymyxin-Resistant *Escherichia coli* from Outpatients in Santa Catarina Southern Brazil. *Microb Drug Resist.* 2020; 26 (11): 1326-1333.

Zhang S, Abbas M, Rehman MU, Wang M, Jia R, Chen S, et al. Updates on the global dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli*: An emerging threat to public health. *Science of The Total Environment.* 2021; 799: DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149280>