DÉBORA SATIE NAGANO

Caracterização epidemiológica e microbiológica da disseminação do gene de resistência plasmidial à colistina*, mcr-1,* no Hospital das Clínicas da FMUSP

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Doença Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Prof.ª Dra. Silvia Figueiredo Costa

São Paulo

2019

DÉBORA SATIE NAGANO

Caracterização epidemiológica e microbiológica da disseminação do gene de resistência plasmidial à colistina*, mcr-1,* no Hospital das Clínicas da FMUSP

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Doença Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Prof.ª Dra. Silvia Figueiredo Costa

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nagano, Débora Satie
Caracterização epidemiológica e microbiológica da disseminação do gene de resistência plasmidial à colistina, mcr-1, no Hospital das Clínicas da FMUSP / Débora Satie Nagano. -- São Paulo, 2019.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Silvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1.mcr-1 2.Colistina 3.Carbapenêmicos 4.Enterobacteriaceae 5.Plasmídeos 6.Infecção hospitalar

USP/FM/DBD-268/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Silvia Figueiredo Costa, pela oportunidade do ingresso na pesquisa científica. Espero continuar desenvolvendo trabalhos em parceira e que essa conquista seja a primeira de muitas.

À minha família, em especial, aos meus pais, Celina e Mitsuo, meu irmão Murilo e meus avós, Akiho, Fumiko, Hiroshi, Misako, por todo o apoio que me deram em todas às novas empreitadas em minha vida.

Aos meus tios e tias que sempre me apoiaram.

À Dra. Roberta Ruedas Martins, pela orientação, pelo conhecimento compartilhado e construído, sem a qual esse trabalho não seria possível. E pela amizade, que continuará longa e próspera.

Ao Lucas Franco, pela ajuda e companheirismo, principalmente na reta final.

À Andreia Alcaia, secretária do LIM-49, pelos conselhos, apoio e amizade, que me ajudaram a caminhar rumo ao próximo passo em minha carreira.

À Ana Paula Marchi, Evelyn Sanchez e Micheli Mederios pela ajuda e pelo apoio.

Aos amigos e colegas dos laboratórios LIM-46 e LIM-49: Bruna Moraes, Camila Rizek, Esther Lira, Gaspar Camilo, Gessica Lorena, Juliana Januário, Sânia Santos, Tatiana Orsi, Victor Lima, Camila Cruz, Flávia Sales, Ingra Morales e Natália Bueno.

Ao Grupo de Controle de Infecção Hospitalar (GCIH), em especial, ao Lauro Perdigão e Matias Salomão pelo apoio e orientação na área clínica e estrutural do HC-FMUSP.

À Dra. Anna Sara Levin, pelos ensinamentos e discussões.

Ao Carlos Eduardo Fuzaro e Dra. Inneke Heijden, que me apresentaram o LIM-49.

À Roseli Antônia Santo, secretária da pós-graduação, pelas orientações e amizade.

Ao Laboratório de Sanidade Suína da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

Aos meus amigos, Alexsandre, Amanda, Anna Laura, Deborah, Gabriel, Izadora, Marcela, Marcelo, Renata, Ronaldo, Victória. Yacov.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Médica – 49 da Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro ao aluno pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ANEXOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução 1

1.1 Resistência bacteriana 1

1.2 Enterobactérias 3

1.3 Polimixinas 4

1.4 Uso de colistina 6

1.5 Resistência cromossomal a colistina 7

1.6 *mobile colistin resistance* (MCR) 8

1.6.1 Origem do *mcr* 9

1.6.2 Quadro atual 10

1.6.3 Brasil 16

1.7 Bombas de efluxo 20

2. Justificativa 22

3. Objetivos 23

3.1 Principal 23

3.1 Secundários 23

4. Materiais e Métodos 24

4.1 Local de estudo 24

4.2 Dados clínicos 25

4.2.1 Definições 25

4.2.2 Coleta de dados clínicos 26

4.3 Coleta e processamento de amostras clínicas 26

4.4 Isolamento de bactérias 27

4.5 Identificação dos isolados 28

4.6 Extração de DNA por método de fervura 29

4.7 Identificação de gene *mcr-1* e plasmídeos tipo IncX4 29

4.8 Amostras positivas para o gene *mcr-1* por PCR 30

4.8.1 Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) 32

4.8.2 Avaliação de ação de bombas de efluxo 32
4.8.2 Conjugação 32
4.8.3 Extração de DNA plasmidial 33
4.8.4 Sequenciamento Total de Genoma (WGS) 34
4.8.5 Análise de genes de resistência cromossomal à colistina 34
4.9 Análise estatística 35
4.10 Alinhamento e similaridade de amplicons 36
5. Resultados 37
5.1 Pacientes 38
5.2 Isolados 42
5.3 Alinhamento e similaridade de amplicons 47
5.4 Conjugação 49
5.5 Análise de genes cromossomais de resistência a colistina 50
5.6 Análise de ação e genes de bombas de efluxo para colistina 51
6. Discussão 53
7. Conclusões 60
8. Anexos 62
8.1 Anexo 1: Parecer de aprovação da Comissão de Ética na Plataforma Brasil 62
8.2 Anexo 2: Perfil da população estudada com relação a gênero, idade, doenças de base, tempo de hospitalização, tempo de contato e desfecho 65
8.3 Anexo 3 – Isolados dos casos A (Pronto Socorro, 31 de agosto de 2016), B (UP4C – UTI da Traumatologia, 12 de setembro de 2016), C (UP4C – UTI da Traumatologia, 21 de dezembro de 2016) e D (UPSCI – Unidade de Cuidados Intermediários do Pronto Socorro, 2 de janeiro de 2017) e de respectivos contactantes 69
8.4 Anexo 4 – Alinhamento dos amplicons gerados por sequenciamento Sanger dos isolados CB', CB13p, CC, CC4 e CD com fragmento alvo de 309pb do gene *mcr-1*, de CB' com o gene ICR^{Mo} e dos 5 amplicons entre si. 71
8.5 Produção Científica 74
8.5.1 Artigo publicado como colaborador 74
8.5.3 Resumo publicado como colaborador 75
8.5.3 Participação em Congresso 76
9. Referências 77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de ação da colistina contra membranas de bactérias Gram-negativas 5
Figura 2 – Distribuição de relatos de mcr no mundo. 15
Figura 3 – Fluxo de trabalho desde notificação de caso à identificação de isolados positivos para mcr-1 por PCR. 27
Figura 4 – Experimentos realizados nos isolados positivos para mcr-1 por PCR. 31
Figura 5 – Fórmula para cálculo de similaridade equivalente a partir de similaridade bruta obtida por comparação de alinhamento entre fragmentos do PCR com o fragmento alvo do gene mcr-1, pelo programa BioEdit (HALL, 1999) 36
Figura 6 – Intervalo de tempo entre identificação do caso (colonizado e/ou infectado por Enterobactérias resistentes a colistina) indicado pela primeira data, e coletas das amostras de swab retal dos pacientes contactantes (internados no mesmo período e unidade do caso) indicados pelas datas seguintes. 37
Figura 7 – Árvore filogenética de amplicons de cinco isolados positivos para mcr-1 confirmados por sequenciamento Sanger de pacientes casos e contactantes 49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resumo de estudos de *mcr* no Brasil, referente a variante do gene, anos, locais e tipos de amostras identificados, espécie de isolados e tipo de plasmídeo carreador,até junho de 2019 19
Quadro 2 – Características dos quatro pacientes classificados como caso. Os isolados destas amostras não foram inclusos no presente trabalho 25
Quadro 3 – Sequências dos primers utilizados, tamanho esperado de amplicons e alvos 30
Quadro 4 – Genes cromossomais de resistência a colistina 35
Quadro 5 – Resultados de CIM de antimicrobianos testados contra Enterobactérias resistentes a colistina isoladas de pacientes casos (colonizados e/ou infectados por Enterobactérias resistentes a colistina) e de pacientes contactantes (internados na mesma unidade e período de um caso), no HC-FMUSP de agosto de 2016 a janeiro de 2017, PCR para mcr-1 e plasmídeo tipo IncX4 e sequenciamento Sanger 44
Quadro 6 – MLST, genes de resistência adquirida, bombas de efluxo e porinas, tipos de plasmídeos e fatores de virulência de bactérias Gram-negativas resistentes a colistina isoladas de pacientes casos (colonizados e/ou infectados por Enterobactérias resistentes a colistina) e de pacientes contactantes (internados na mesma unidade e período de um caso), no HC-FMUSP de agosto de 2016 a janeiro de 2017 por Sequenciamento Total do Genoma 41
Quadro 7 – Análise de genes cromossomais de resistência a colistina de cinco isolados Enterobactérias positivas para mcr-1 identificadas no HC-FMUSP, no período de agosto de 2016 a janeiro de 2017 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil de 23 pacientes estudados, incluindo 3 casos (colonizados e/ou infectados por Enterobactérias resistentes a colistina e sensíveis a carbapenêmicos) e 20 contactantes (pacientes que estiveram na mesma unidade e período que o caso) 39

Tabela 2 – Análise bivariada de fatores de risco associados a aquisição do gene *mcr-1* por pacientes internados no HC-FMUSP identificados entre setembro de 2016 a janeiro de 2017 41

Tabela 3 – Análises multivariadas de uso e tempo de uso de colistina e meropenem, ter sido submetido a cirurgia e tempo de internação prévio a coleta de amostra em associação a aquisição do gene *mcr*-1 por pacientes internados no HC-FMUSP de setembro de 2016 a janeiro de 2017 42

Tabela 4 – Total de 30 isolados de bactérias Gram-negativas triados em meio com colistina e identificados por MALDI-TOF. 43

Tabela 5 – Similaridades equivalentes de alinhamento de amplicons de isolados positivos para *mcr-1* de pacientes casos e contactantes com fragmento alvo de PCR para *mcr-1* e gene ICR^{Mo} 47

Tabela 6 – Similaridades equivalentes entre amplicons de PCR para *mcr-1* de cinco isolados positivos para o gene confirmados por sequenciamento Sanger de pacientes casos e contactantes 48

Tabela 7 – Teste de conjugação de plasmídeos carreadores de *mcr-1* de Enterobactérias isoladas de pacientes casos e contactantes, CIM de colistina e PCR para *mcr-1* de isolados transconjugantes 50

Tabela 8 – Teste de ação de bombas de efluxo com CCCP de cinco isolados de Enterobactérias resistentes a colistina positivas para *mcr-1*, identificadas no HC-FMUSP no período de agosto de 2016 a janeiro de 2017 52

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Parecer de aprovação da Comissão de Ética na Plataforma Brasil . 62
Anexo 2: Perfil da população estudada com relação a gênero, idade, doenças de base, tempo de hospitalização, tempo de contato e desfecho 65
Anexo 3 – Isolados dos casos A (Pronto Socorro, 31 de agosto de 2016), B (UP4C – UTI da Traumatologia, 12 de setembro de 2016), C (UP4C – UTI da Traumatologia, 21 de dezembro de 2016) e D (UPSCI – Unidade de Cuidados Intermediários do Pronto Socorro, 2 de janeiro de 2017) e de respectivos contactantes. 69
Anexo 4 – Alinhamento dos amplicons gerados por sequenciamento Sanger dos isolados CB', CB13p, CC, CC4 e CD com fragmento alvo de 309pb do gene *mcr-1*, de CB' com o gene ICR^{Mo} e dos 5 amplicons entre si. 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC – American Type Culture Collection

BGN – Bactérias Gram-negativas

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

CARD – The Comprehensive Antibiotic Resistance Database

CCCP - Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

EIRC – Espécies Intrinsecamente Resistentes a Colistina

PS – Pronto Socorro

ESBL – Extended Spectrum Beta Lactamase

EUCAST – European Comittee on Antimicrobial Susceptibility Testing

L-Ara4N – 4-amino-4deoxyl-L-arabinose

LPS - Lipopolisacarídeos

mcr – Mobile colistin resistance

MHCA – Muller Hinton Cátio Ajustado

PEtN – Phosphoethanolamine transferase

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

ST – Sequência Tipo

UP4C – Unidade de Terapia Intensiva da Traumatologia

UPSCI Unidade do Pronto Socorro de Cuidados Intermediários

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

RESUMO

Nagano, DS. Caracterização epidemiológica e microbiológica da disseminação do gene de resistência plasmidial à colistina*, mcr-1,* no Hospital das Clínicas da FMUSP. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2019.

Introdução: O gene de resistência plasmidial à colistina, *mcr-1* (do inglês *mobile colistin resistance*) foi identificado pela primeira vez no final de 2015 e desde então foi descrito em isolados de animais, humanos e ambiente. Entretanto, estudos conduzidos em hospitais brasileiros são escassos. **Objetivos:** Descrever a disseminação de *mcr-1* em unidades que apresentaram pacientes (caso) com infecção e/ou colonização por Enterobactérias resistentes a colistina e sensíveis a carbapenêmicos, e em pacientes hospitalizados na mesma unidade e período que os casos (contactantes), entre agosto de 2016 a janeiro de 2017. Avaliar outros mecanismos de resistência à colistina desses isolados. **Material e Métodos:** Foi realizada coleta de amostras com *swab* retal, processamento em ágar MacConkey e triagem em meio com colistina. Todos os isolados obtidos foram testados para *mcr-1* por PCR e confirmados por sequenciamento Sanger. Foi criado um banco de dados no programa Epi Info™ (CDC) com variáveis clínicas e demográficas dos pacientes. Análise univariada dos fatores de risco associados com aquisição do gene *mcr-1* foi realizada e o valor de $p \leq 0.05$ foi considerado significativo. Variáveis significativas foram colocadas em um modelo de regressão logística. Foram realizadas concentração inibitória mínima para colistina, meropenem e imipenem; extração de DNA plasmidial; PCR para plasmídeo tipo IncX4; sequenciamento total do genoma; conjugação e teste para bomba de efluxo com CCCP dos isolados positivos para o gene *mcr*-1. **Resultados:** Todos os contactantes dos 3 casos, totalizando 20 pacientes identificados entre setembro de 2016 a janeiro de 2017 foram avaliados. O tempo de hospitalização médio prévio a coleta de amostras foi de 21 dias para os 23 pacientes, 54 dias para os 3 pacientes caso e 16 dias para

os 20 contactantes. O uso de meropenem, tempo de uso de meropenem e de colistina durante internação, ser submetido a cirurgia e tempo de internação prévio a coleta foram considerados fatores de risco para aquisição de *mcr-1* na análise univariada. Entretanto, apenas tempo de uso meropenem foi fator de risco foi fator de risco independente. Foram obtidos 7 isolados positivos para *mcr-1* de *K. pneumoniae, K. quasipneumoniae, K. aerogenes, P. mirabilis*, *P. stuartii* e *M. morganii*, sendo as últimas 3 espécies intrinsecamente resistentes à colistina. Porém, não foi possível transferir o gene *mcr*-1 por conjugação. O gene *mcr-1* não foi encontrado por sequenciamento total do genoma, mas o PCR foi confirmado por sequenciamento Sanger em 5 isolados (2 *K. pneumoniae*, 1 *K. aerogenes*, 1 *M. morganii* e 1 *P. mirabilis*). Nenhum isolado foi positivo para plasmídeo tipo IncX4 por PCR nem por sequenciamento total do genoma. Dois isolados de *K. pneumoniae*, resistentes à colistina, ao meropenem e ao imipenem eram coprodutores de KPC-2, além de variadas ESBLs. Um isolado de *K. quasipneumoniae* (anteriormente *K. pneumoniae* pertencente ao ST-1308) foi descrito pela primeira vez no Brasil como carreador de *mcr-1.* Os isolados de *Klebsiella spp.* também apresentaram inativação de *mgrB,* relacionado a resistência a colistina. Todos os isolados sequenciados apresentaram diminuição de CIM para colistina na presença de inibidor de bomba de efluxo (CCCP). Os genes codificadores de AcrAB-TolC de bomba de efluxo apresentaram mutações no isolado de *P. stuartii* que também teve variação menor de CIM. **Conclusão:** O gene *mcr*-1 foi identificado em diferentes gêneros e espécies de Enterobactérias, incluindo as intrinsecamente resistentes à colistina. Outros mecanismos de resistência à colistina como mutação cromossômica e bomba de efluxo, foram observados em isolados carreadores de *mcr*-1, evidenciando a complexidade da resistência a colistina nas Enterobactérias. O tempo de uso de meropenem foi o único fator de risco independente para aquisição do gene *mcr*-1.

Descritores: *mcr-1*; Colistina; Carbapenêmicos; *Enterobacteriaceae*; Plasmídeos; Infecção Hospitalar.

ABSTRACT

Nagano, DS. Epidemiological and microbiological characterization of dissemination of plasmid-mediated resistance gene to colistin, *mcr-1*, at Hospital das Clínicas – FMUSP. [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2019.

Introduction: The plasmid-mediated resistance gene to colistin, *mcr-1* (mobile colistin resistance) was first identified by the end of 2015 and ever since was described in isolates from animals, humans and environment. However, studies conducted in Brazilian hospitals are scarce. **Aims:** Describe the dissemination of the *mcr-1* gene in units where patients (case) with infection and/or colonized by Enterobacteria resistant to colistin and susceptible to carbapenems, and patients hospitalized at the same unit and period as the cases (contact patients), between August 2016 and January 2017. Evaluate other mechanisms of resistance to colistin in these isolates. **Material and Methods:** Samples were collected with rectal *swabs*, processed in MacConkey agar and screened on medium with colistin. All isolates obtained were tested for *mcr-1* by PCR and confirmed by Sanger sequencing. A database was created in the Epi Info™ program (CDC) with clinical and demographic variables from patients. Univariate analysis to risk factors associated to *mcr-1* gene acquisition was performed and *p*-value ≤ 5 was considered significant. Significant variables went through logistic regression model. Isolates positive to *mcr-1* gene by PCR were submitted to minimum inhibitory concentration determination to colistin, meropenem and imipenem; plasmid DNA extraction; whole genome sequencing; conjugation and IncX4 plasmid type by PCR. **Results:** All contact patients from 3 cases, totalizing 20 patients identified between September 2016 and January 2017 were evaluated. Average hospitalization time before sample collection was 21 days for the 23 patients, 54 days the 3 case patients and 16 days for the 20 contact patients. Use of meropenem, time of use of meropenem and colistin in hospital, surgical procedure and hospitalization time before sampling were considered risk factors

for acquisition of *mcr-1* in unadjusted analysis. Nevertheless, only time of meropenem use was an independent risk factor. Seven isolates positive for *mcr-1* were obtained of *K. pneumoniae, K. quasipneumoniae, K. aerogenes, P. mirabilis, P. stuartii* and *M. morganii,* the last three are species intrinsically resistant to colistin. However, it was not possible to transfer *mcr-1* gene by conjugation. The *mcr-1* gene was not found through whole genome sequencing, but PCR products were confirmed by Sanger sequencing in 5 isolates (2 *K. pneumoniae*, 1 *K. aerogenes*, 1 *M. morganii* and 1 *P. mirabilis*). None of the isolates were positive for IncX4 plasmid type by PCR neither whole genome sequencing. Two *K. pneumoniae* isolates, resistant to colistin, meropenem and imipenem, were coproducers of KPC-2, as well as others ESBLs. One isolate of *K. quasipneumoniae* (former *K. pneumoniae* of ST-1308) here first described in Brazil and as *mcr-1* carrier. The *Klebsiella spp.* isolates also had inactivation of *mgrB*, related to colistin resistance. All sequenced isolates presented lower MIC to colistin in presence of efflux pump inhibitor (CCCP). Codifying genes of AcrAB-TolC efflux pump presented mutations in *P. stuartii* which MIC also varied less than others. **Conclusion:** The *mcr-1* gene was identified in different genera and species of Enterobacteria, including in intrinsically resistant ones. Other mechanisms of resistance to colistin as chromosomal mutations and efflux pump were observed in isolates carrying *mcr-1*, highlighting colistin resistance complexity in Enterobacteria. Time of use of meropenem was the only independent risk factor for acquisition of *mcr-1* gene.

Descriptors: *mcr-1*; Colistin; Carbapenems; *Enterobacteriaceae*; Plasmids; Cross infection.

1. Introdução

1.1 Resistência bacteriana

Até o início do século XX, ainda não dispúnhamos de tratamento para infecções bacterianas, fato que estimulou a busca por agentes terapêuticos. Em 1928, um composto com ação bactericida foi descoberto por Alexander Fleming, marcando a história da microbiologia com a descrição da penicilina. Este composto é naturalmente produzido por fungos, provavelmente como forma de eliminar a concorrência por ambiente e recursos. A partir disso, a pesquisa científica caminhou para busca de outros agentes antibacterianos (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Embora a descoberta da penicilina tenha possibilitado o tratamento de infecções bacterianas durante a Segunda Guerra Mundial (GUIMARÃES *et al.*, 2010), em 1940, já foram reportados isolados de bactérias Gram-positivas resistentes a este medicamento (HAWKEY, 2008). Fato que se repetiu para todos os compostos descobertos e utilizados desde então, ou seja, concomitante à utilização de antibióticos, podemos encontrar casos de bactérias resistentes aos mesmos (HAWKEY, 2008).

Atualmente, sabe-se que um dos grandes catalisadores para o surgimento de resistências à antimicrobianos são os próprios medicamentos, afinal eles exercem pressão seletiva sobre diversas populações bacterianas, e dessa forma sobrevivem apenas os isolados bacterianos que possuam características que lhes permitam resistir a eles (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

A resistência aos antimicrobianos é geralmente associada ao ambiente hospitalar. De fato, acredita-se que a principal causa da velocidade com que a resistência surge é o uso inapropriado de antimicrobianos. Esta prática aumenta os custos à saúde pública, por exemplo, pela dificuldade de diagnóstico ou falta de informação, automedicação ou descontinuidade de tratamento (LOUREIRO *et al.,* 2016). Não bastando, os custos do tratamento adicional, disponibilização de tempo, espaço e recursos envolvem o setor

administrativo e econômico das instituições e agrava-se o problema de saúde pública (FIOL *et al.*, 2010).

No entanto, além do setor da saúde, os antimicrobianos também são utilizados na medicina veterinária e agricultura. Através dos alimentos que consumimos, as bactérias que colonizam animais, como aves e suínos, podem chegar aos seres humanos e fazer parte de nossa microbiota e/ou causar infecções E devido à utilização de antimicrobianos, a probabilidade de se tratar de bactérias resistentes aumenta (HAWKEY, 2008).

Além dos microrganismos resistentes provenientes dos alimentos, as bactérias são capazes de transferir genes horizontalmente, ou seja, não se limitam às células filhas. Genes codificadores de resistência à antimicrobianos podem ser compartilhados com outras linhagens da mesma ou de outra espécie (HAWKEY, 2008). Essa via se dá por meio dos elementos móveis, como: transposons, sequências que podem se inserir em diferentes posições no DNA e carregar genes de resistência associados; integrons, carreiam genes de resistência e fazem recombinações em lugares específicos no DNA; e os plasmídeos, estruturas extracromossomais e independentes (SHINTANI *et al.,* 2015; PARTRIDGE, 2015)

Os plasmídeos são compartilhados naturalmente através do processo chamado conjugação, no qual cria-se uma ponte entre duas células e elas conseguem trocar esses fragmentos de DNA extracromossomais (SHINTANI *et al.,* 2015). Processo também comumente utilizado para teste de transmissibilidade *in vitro*.

Os plasmídeos podem proporcionar uma chance maior de sobrevivência às suas bactérias hospedeiras, mas nem todos são iguais. Cada estrutura é nomeada de acordo com sua característica de replicação e compatibilidade ou incompatíbilidade com outros plasmídeos (BANU e PRASAD, 2017). Basicamente, eles possuem origens de vegetativas de replicação (oriV) (SHINTANI *et al.,* 2015), compostas por genes essenciais à replicação plasmidial, chamados *cop* e *inc* responsáveis pelo início da replicação. E o gene *rep*, que controla o processo para que o mesmo não se perca ou que prejudique a célula

hospedeira e, por consequência, a si mesmos (COUTURIER *et al.,* 1988; NORMAN *et al.,* 2009).

Desde os anos 1970, sua nomenclatura é baseada em sua incompatibilidade, que consiste em um plasmídeo presente em uma bactéria restringir a permanência de outro similar a ele através do próprio supressor de replicação (SUMMERS, 1996). Pelo fato de serem semelhantes, o supressor funciona para ambos, sendo incompatíveis para permanecerem juntos, assim são considerados da mesma família de incompatibilidade (COUTURIER *et al.,* 1988; CARATTOLI *et al.,* 2005). Essa característica também é responsável pela perda de plasmídeos pelas bactérias hospedeiras de forma gradual (SUMMERS, 1996). Outros genes são necessários para sua adaptação, estabilidade e propagação, como os codificadores de estruturas de conjugação, *mob* e *tra* (NORMAN *et al.,* 2009).

Dessa forma, uma resistência, codificada por um gene plasmidial, pode ser transferida de uma bactéria presente em um alimento ingerido para uma bactéria da microbiota intestinal, por exemplo, ou para um patógeno (GOULD, 2008). Com o auxílio de transposons e integrons, DNA cromossomal e plasmidial podem recombinar dentro da mesma célula, diversificando os genes de resistência que carreiam. E os plasmídeos são responsáveis pela disseminação extracelular (HAWKEY e JONES, 2009; PARTRIDGE, 2015). A capacidade de transferência horizontal somada ao acúmulo de diferentes plasmídeos, e outros elementos móveis, justifica a existência de microrganismos multirresistentes (HAWKEY, 2008).

1.2 Enterobactérias

As Enterobactérias representam uma grande preocupação na questão de multirresistência à antimicrobianos (RUPPÉ *et al.,* 2015). Desde os anos 1960, quando foram introduzidas as ampicilinas, houve um aumento de resistência aos beta-lactâmicos, devido a seleção de bactérias produtoras de beta-lactamases (HAWKEY, 2008; RUPPÉ, *et al.,* 2015)

A primeira alternativa de tratamento foi utilizar cefalosporinas de terceira geração. Porém, a resistência a esse antibiótico aumentou devido a disseminação de beta-lactamases. Cujos genes sofreram mutações pontuais, e assim proporcionaram resistência também a essa classe de antimicrobianos, originando as beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) (HAWKEY, 2008; HAWKEY e JONES, 2009; RUPPÉ, *et al.,* 2015).

Rapidamente as Enterobactérias produtoras de ESBL se tornavam mais frequentes, incluindo aquelas que também eram resistentes a fluoroquinolonas, cotrimoxazol e aminoglicosídeos ganhavam maior espaço (HAWKEY, 2008; RUPPÉ *et al.,* 2015). Com o aumento de cefalosporinases plasmidiais, os carbapenêmicos passaram a ser amplamente utilizados. Seguido de um aumento proporcional de carbapenemases classe A, como KPC, umas das mais difundidas no mundo, classe B, como VIM, IMP e NDM, e classe D, como variantes de OXA-48 (HAWKEY e JONES, 2009; RUPPÉ, *et al.,* 2015).

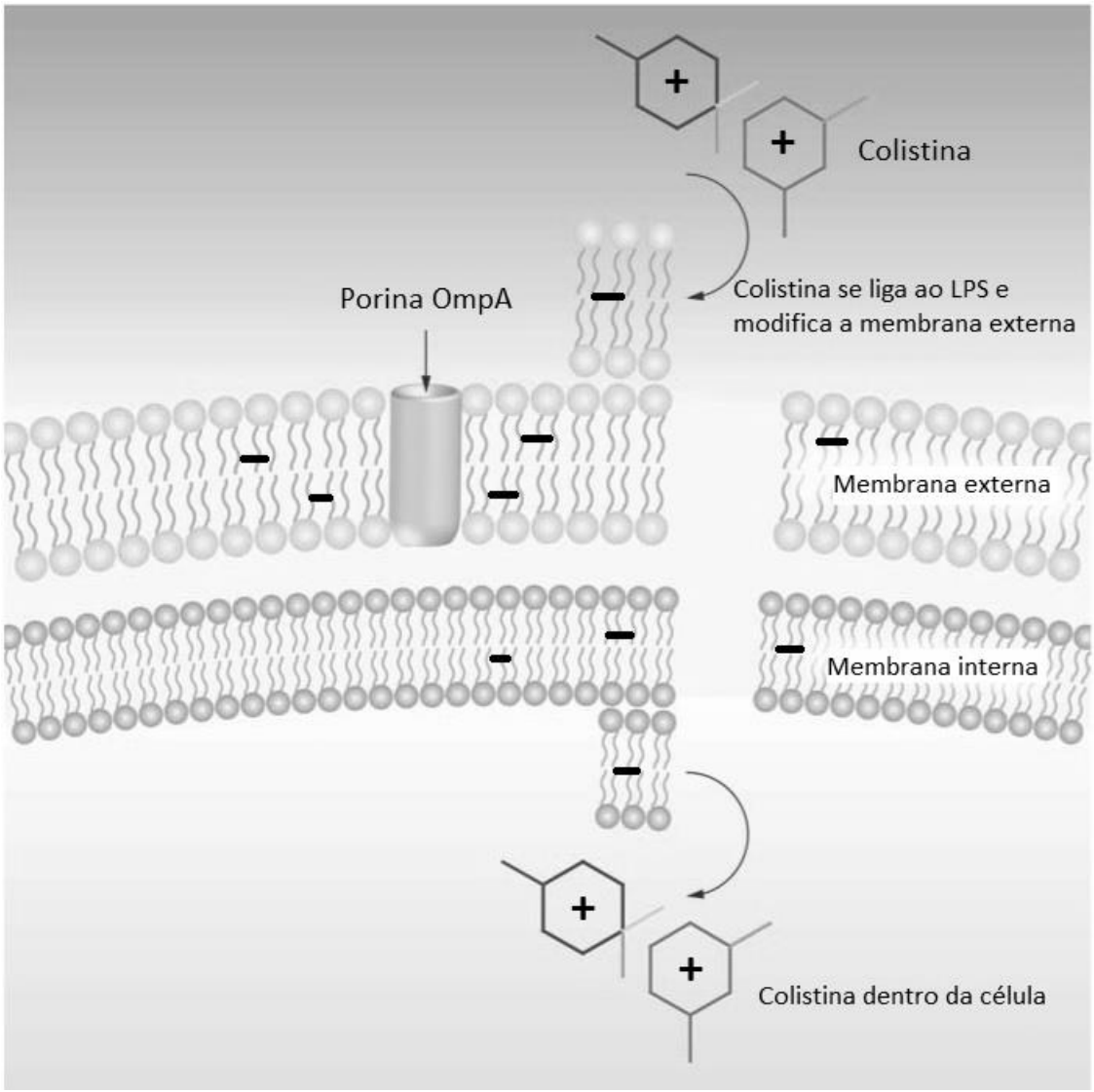
A relação entre o uso de antimicrobianos resistência é evidenciada pelo histórico das beta-lactamases, pois, segundo Davies e Davies (2010), entre os anos 1970 e 2010 já se somavam aproximadamente 1000 beta-lactamases conhecidas e cumulativas.

Por volta dos anos 2000, quinolonas e fluoroquinolonas também perderam espaço com a disseminação via plasmídeos de resistências a estes antimicrobianos, principalmente associadas a ESBLs (HAWKEY e JONES, 2009; RUPPÉ, *et al.,* 2015).

1.3 Polimixinas

Devido às limitadas opções terapêuticas para tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas multirresistentes, as polimixinas passaram a ser mais utilizadas. A classe foi descoberta por volta de 1960 (BISWAS *et al.,* 2014), e sua utilização diminuiu a partir dos anos 1970 devido à sua alta toxicidade, mas que retornaram como medicamentos de último recurso (SHERRY e HOWDEN, 2018). Comercialmente disponíveis, tem-se a polimixina B e a polimixina E, conhecida também como colistina (BISWAS *et al.,* 2014).

O mecanismo de ação das polimixinas ocorre por meio da desestabilização da membrana externa de bactérias Gram-negativas, que têm sua permeabilidade aumentada causando um extravasamento do conteúdo celular e consequente morte celular (POIREL *et al.,* 2017). Especificamente, este composto catiônico se liga ao grupo fosfato do lipídeo A de lipopolisacarídeos (LPS) presentes na membrana, o que gera uma alteração em sua conformação (Figura 1) (POIREL *et al.,* 2017; OLAITAN *et al.,* 2014).



Adaptado de Biswas e colaboradores (2014). Legenda: LPS – Lipopolisacarídeo. Sinais de + e – representam a carga elétrica.

Figura 1 – Mecanismo de ação da colistina contra membranas de bactérias Gram-negativas

1.4 Uso de colistina

Embora a colistina seja considerada a última opção de tratamento de infecções causadas por Enterobactérias multirresistentes. Esse antimicrobiano é amplamente utilizado na criação de animais de produção, sendo adicionado à comida, como promotor de crescimento, medida profilática e para tratamento (KEMPF *et al.,* 2016).

A partir de 2016, na China, o ministro da Agricultura baniu sua utilização (WALSH e WU, 2016). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), diante dos relatos no Paraná de bactérias resistentes a colistina, publicou a normativa nº 45, proibindo futura produção com o antimicrobiano, mas permitindo comércio do que se havia em estoque, mediante fiscalização (MAGGI, 2016). Apesar de menos utilizada na clínica, a colistina ganhou maior espaço no decorrer do tempo, como observado nos estudos de Hayakawa e colaboradores (2012), Samonis e colaboradores (2014) e Abat e colaboradores (2015).

O primeiro estudo relatou um aumento significativo de isolados de *P. stuartii*, de infecção e colonização, diretamente relacionado a aumento significativo do uso de colistina, em um período de cinco anos no Detroit Medical Center (HAYAKAWA *et al.,* 2012). No estudo de Samonis e colaboradores (2014), não foi observada relação entre consumo de colistina no hospital e o total de isolados de espécies intrinsecamente resistentes a colistina (EIRC) (*Proteus spp., Providencia spp., Serratia spp*. e *Morganella spp.*). Considerando que o aumento do uso, entre os dois períodos estudados, só foi significativo na UTI. No entanto, o consumo de colistina teve influência no aumento de infecções nosocomiais por EIRC. Curiosamente, foi relatado que o aumento no isolamento de EIRC na UTI não teve relação com o consumo do antimicrobiano na unidade, porém foi destacado que seu valor de p=0,057, próximo do considerado significativo, indicaria um fator para manter o seu uso sob vigilância (SAMONIS *et al.,* 2014).

Diferentemente dos anteriores, o estudo de Abat e colaboradores (2014) incluiu apenas isolados de infecção de EIRC, sem repetição de amostra ou paciente. No período de 5 anos, o aumento de pacientes positivos para

infecção por EIRC em UTIs e unidades de cuidado prolongado foi relacionada ao aumento significativo no uso de colistina aerossol nessas unidades. Em ambos os estudos de EIRC, as espécies mais encontradas foram *Proteus spp*., seguido de *Serratia spp.* e *Morganella spp.,* ou vice e versa, e menos frequentemente, *Providencia spp* (SAMONIS *et al.,* 2014; ABAT *et al.,* 2014).

1.5 Resistência cromossomal a colistina

A resistência cromossomal a colistina resulta, em geral, de modificações no lipídeo A, que compõe os lipopolisacarídeos (LPS) da membrana bacteriana externa, que por sua vez são os alvos primários da colistina (BARON *et al.,* 2016). Mais comumente, as mudanças ocorrem de duas formas: adição de 4-amino-4-deoxyl-L-arabinose (L-Ara4N) e/ou adição de fosfoetanolamina transferase (PEtN) ao lipídeo A (OLAITAN *et al.,* 2014; POIREL *et al.,* 2017).

A resistência também pode ocorrer por adição de PEtN a porção do ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosônico (Kdo) do LPS (BARON *et al.,* 2016). Essas adições resultam no aumento da carga elétrica da membrana, tornando-a menos atraente para ligação de colistina (OLAITAN *et al.,* 2014; POIREL *et al.,* 2017; AGHAPOUR *et al.,* 2019).

A cascata de genes envolve o componente *phoPQ*, que possui um regulador negativo *mgrB*, que ativa diretamente o operon *arnBCADTEF*, sintetizando L-Ara4N, e indiretamente por meio do gene *pmrD*, seguido do componente *pmrAB* e então o operon. Além disso, o componente *pmrAB* também ativa genes codificadores de PEtN, como *eptA, eptB* e *eptC*, cada um adicionado a diferentes partes do LPS (OLAITAN *et al.,* 2014; BARON *et al.,* 2016; POIREL *et al.,* 2017; AGHAPOUR *et al.,* 2019).

Na espécie *K. pneumoniae*, são mais comuns relatos de mutações relacionadas à inativação do *mgrB,* que causa um *upregulation* do restante da cascata levando a resistência a colistina, além de mutações em *phoPQ* e *pmrAB* (BARON *et al.,* 2016).

Recentemente, foi descrito em *K. pneumoniae* o componente *crrAB* que afeta ativação de *pmrAB* através do gene *crrC*, indicando uma nova via para síntese de L-Ara4N e/ou PEtN. Foi observado em isolados que eram resistentes a colistina, mas que não se sabia o mecanismo de resistência, uma vez que os genes até então analisados estavam conservados (WRIGHT *et al.,* 2015; CHENG *et al.,* 2016). Especificamente do gene *crrB*, foram descritas pelo menos quatro mutações relacionadas a maior nível de resistência a colistina (JAYOL *et al.,* 2017).

Os mecanismos de resistência a colistina na espécie *K. aerogenes* ainda não foram tão especificados como em *K. pneumoniae*, mas uma hipótese é que ocorra de forma similar por meio de mutações no gene *mgrB* (BEDENIĆ *et al.,* 2017) ou nos componentes *phoPQ* e *pmrAB* (NORGAN *et al.,* 2016). Apenas uma mutação foi descrita para espécie no gene *pmrA* (G53S) relacionada a resistência a colistina (POIREL *et al.,* 2017). Apesar de outras mutações sinônimas entre ambas as espécies, em *K. aerogenes* não há relatos relacionando-as com resistência a colistina (OLAITAN *et al.,* 2014).

Em espécies intrinsecamente resistentes a colistina, como *P. mirabilis, P. stuartii* e *M. morganii*, os mecanismos são similares, sendo decorrentes de uma ativação constante do operon *arnBCADTEF*, assim o lipídeo A constitutivamente possui L-Ara4N ligado a ele (OLAITAN *et al.,* 2014; BARON *et al.,* 2016; POIREL *et al.,* 2017; SHERRY e HOWDEN, 2018). Além da ativação de genes codificadores de PEtN nomeados *eptC, cptA* e *eptB,* respectivos a cada uma das três espécies acima (AQUILINI *et al.,* 2014; OLAITAN *et al.,* 2014; AGHAPOUR *et al.,* 2019).

1.6 *mobile colistin resistance* (MCR)

Até o final de 2015, pensava-se que os mecanismos de resistência a colistina eram apenas cromossomais. Entretanto em 2016, Liu e colaboradores descreveram pela primeira vez um gene plasmidial codificador de uma PEtN, nomeado *mobile colistin resistance* (*mcr-1*). O gene foi encontrado em um isolado de *E. coli* proveniente de uma amostra de *swab* retal de suíno. Este gene

era carreado por um plasmídeo tipo IncI2 e conjugado com sucesso, proporcionando resistência a uma concentração de 8 mg/L de colistina ao isolado hospedeiro.

Em uma investigação mais abrangente, observou-se que este gene era frequente em isolados de *E. coli* coletados entre os anos 2012 a 2014 de animais de produção, e em amostras humanas ocorreram em menor proporção. E que já havia sido encontrado em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* causadores de infecção em humanos (LIU *et al.,* 2016).

Até o momento, há descrição de variantes de *mcr-1*, bem como de *mcr-2* a *mcr-8* (REBELO *et al.,* 2018; YANG *et al.,* 2018; WANG *et al.,* 2018c), tanto em amostras animais como humanas. Em relação ao gene *mcr*-1, um estudo de Wang e colaboradores (2018b) analisou 457 isolados, de 2008 a 2016, carreadores do gene depositados no *GenBank* (NCBI). Os autores observaram maior incidência na China, Vietnã e Alemanha. De forma geral, países asiáticos apresentaram maior notificação de isolados *mcr-1*, em seguida, países europeus, Estados Unidos, Brazil e África do Sul.

1.6.1 Origem do *mcr*

Recentemente, descobriu-se que o gene *mcr-1* provavelmente originou-se das espécies *Moraxella catarrhalis* e *Moraxella osloensis*. Em 2017, Kieffer e colaboradores (2017) observaram que algumas espécies de *Moraxella spp.* possuíam em seu DNA cromossomal sequências similares a *mcr-1* e *mcr-2*. Além da *ISApl1*, uma sequência de inserção comumente encontrada junto a *mcr-1* lhe proporcionando mobilidade, e do gene *rep* (replicase) de plasmídeos tipo IncX4, um dos principais carreadores do gene em isolados de *E. coli*.

Uma PEtN encontrada no cromossomo da espécie *M. catarrhalis*, nomeada ICR^{Mc} (*intrinsic colistin resistance* de *M. catarrhalis*), proporcionou resistência a colistina a um isolado de *E. coli* ao ser transmitido via plasmídeo (STOGIOS *et al.,* 2018). Da mesma forma que o gene *mcr-1,* proporcionam resistência a concentrações de 2 mg/L e 4 mg/L de colistina, respectivamente

(STOGIOS *et al.,* 2018). Além disso, a similaridade entre as proteínas foi de 68% em C-terminal, compondo um clado nomeado *MCR-1-like* juntamente do *mcr-2*. Ao passo que *mcr-3, mcr-4, EptA (E. coli)* e *PmrC (Acinetobacter baumannii)* pertencem a um segundo clado, *EptB (E. coli)* a um terceiro clado, *EptA (Neisseria meningitidis*) e *mcr-5 (Legionella spp.)* a um quarto clado e *EptC/CptA* (*Salmonella enterica*) a um quinto clado (STOGIOS *et al.,* 2018).

Assim, sugeriu-se que variantes de *mcr-1* e *mcr-2* e PEtN encontradas em *Moraxella spp*. tenham derivado de um mesmo ancestral (WEI *et al.,* 2018). Após a descrição do ICR^{Mc}, Wei e colaboradores (2018), relataram em *Moraxella osloensis* uma PEtN nomeada ICR^{Mo}, e com uma análise filogenética baseada na sequência de nucleotídeos, descreveram que o clado *MCR-1-like* (STOGIOS *et al.,* 2018) descendeu de sulfatases. Aparentemente, e *mcr* e *ICR* teriam divergido em dois subclados antes do extenso uso de colistina em animais de produção e na clínica.

1.6.2 Quadro atual

Grande parte dos relatos de *mcr-1* são descrições de isolados provenientes de animais de produção, como suínos e galináceos. Na China, alguns estudos de vigilância reportaram isolados de *E. coli* que possuíam plasmídeos carreadores de *mcr-1*, provenientes de amostras de aves de produção, obtidos em 1980 e 2004. Desde 2008, a incidência do gene aumentou, indicando sua circulação no país mesmo em baixas proporções (SHEN *et al.,* 2016). Além disso, chama atenção que isolados de diferentes Sequências Tipo (ST) de *E. coli* produtoras de ESBL venham ganhando espaço também como portadoras de *mcr-1*. Uma vez que a aquisição de um mecanismo de resistência a colistina aumenta suas chances de sobrevivência (WU *et al.,* 2018a).

No Japão, Nishino e colaboradores (2017) descreveram também isolados de *E. coli* carreadores de *mcr-1*, cujas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) para colistina variaram de 8 a 16 mg/L. Esses isolados foram obtidos de carne de aves e suína, de diferentes STs, sendo a maioria multirresistente. Curiosamente, os isolados de amostras de origem japonesa

apresentavam plasmídeos tipo IncI2, enquanto amostras de origem brasileira e espanhola possuíam plasmídeos IncX4 como carreadores de *mcr-1* (NISHINO *et al.,* 2017).

Um estudo de Hadjadj e colaboradores (2017), foi composto de isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae,* de amostras humanas e animais, provenientes de Laos, Tailândia, França, Algéria e viajantes retornando da Arábia Saudita para França. Os autores evidenciaram que a CIM de colistina variou de 2 a 32 mg/L em ambas as espécies com isolados de diferentes STs. Alguns pontos a se destacar deste estudo foram 2 isolados de *E. coli* que além de possuírem plasmídeos conjugáveis IncHI2 carreadores de *mcr-1*, também apresentavam mutação em *phoQ* (E375K) mecanismo de resistência cromossômico. E outro isolado da mesma espécie que após 20 repiques perdeu todos os plasmídeos carreadores de *mcr-1*, assim ficando sensível a colistina (0,25 mg/L) (HADJADJ *et al.,* 2017). Entretanto, três isolados de *K. pneumoniae* que apresentavam mutações cromossômicas: LH131 - *stop codon* prematuro em *mgrB;* LH17 - mutação T157P em *pmrB;* LH61 - substituição de *mgrB*, apresentaram resultados divergentes. Os três, mais um isolado de *K. pneumoniae* sem mutações cromossômicas detectadas, perderam os plasmídeos carreadores de *mcr-1* após 25 repiques. Porém não se tornaram sensíveis a colistina, mantendo as CIM de 32, 12, 16 e 12 mg/L, respectivamente. E apenas o plasmídeo IncI2 de LH61 foi conjugável (HADJADJ *et al.,* 2017). Em geral, os isolados que apresentavam também mutações cromossômicas tinham CIMs maiores que os isolados que continham apenas *mcr-1*. E em comparação, 21 de 25 isolados de *E. coli* possuíam plasmídeos conjugativos, enquanto apenas dois de cinco de *K. pneumoniae* (HADJADJ *et al.,* 2017).

Especificamente em *K. pneumoniae*, a resistência a colistina via mutações cromossomais, principalmente por inativação do *mgrB*, tem um impacto maior no fenótipo do que o *mcr-1* (HADJADJ *et al.,* 2017; ZHANG *et al.,* 2018). Um estudo avaliou dois isolados de *K. pneumoniae* causadores infecção de corrente sanguínea já produtores de carbapenemases. XH209, continha bla_{IMP-4} e pentencia ao ST-17. Sua CIM para colistina evoluiu de 0,06 para 128 mg/L após inativação do *mgrB* por inserção, e para 32 mg/L com o *mcr-1*. No

entanto, com ambos a CIM foi de 128 mg/L. E KP10, continha *bla*$_{KPC-2}$ e pertencia ao ST-11, apresentou aumento da CIM para colistina de 0,06 para 128 mg/L após inativação do *mgrB* por inserção. E para 16 mg/L com o *mcr-1*, no entanto, para ambos a CIM foi de 128 mg/L (ZHANG *et al.,* 2018).

A estabilidade e custo de se manter um plasmídeo pode gerar perda do mesmo, uma vez que um isolado possui um mecanismo cromossomal para sobreviver em presença de colistina, manter um plasmídeo com *mcr-1* pode prejudicar sua taxa de crescimento (HADJADJ *et al.,* 2017; ZHANG *et al.,* 2018). E a não conjugação de plasmídeos pode ocorrer devido a genes *tra* quebrados, mas algumas vezes não há razão especificada (HADJADJ *et al.,* 2017; DRALI *et al.,* 2018).

Além de animais de produção, há relatos de isolados obtidos de amostras de animais de companhia. Em Pequim, foram identificados cães e gatos colonizados por *E. coli* ou *K. pneumoniae* carreadoras de *mcr-1*. o investigarem donos e ração destes, descobriu-se um isolado de *E. coli* carreador de *mcr-1*. A partir dos achados, concluiu-se que a origem de transmissão tenha sido a ração, para os animais de companhia e então para o ser humano (LEI *et al.,* 2017).

No Equador, os estudos de Ortega-Paredes e colaboradores (2016) e Loayza e colaboradores (2018), reportaram um isolado de *E. coli* de ST-609 carreador de *mcr-1* obtido do líquido peritoneal de um garoto de 14 anos. Nos animais em sua residência foram encontrados isolados da mesma espécie também portadores do gene, porém de STs diferentes. Entretanto, por possuírem o mesmo tipo de plasmídeo IncI1γ carreador do gene, concluiu-se que teria ocorrido a disseminação a partir da mesma fonte, apesar de não ter sido possível realizar conjugação dos isolados dos animais (LOAYZA *et al.,* 2018).

Na China, o primeiro estudo epidemiológico e clínico, de Wang e colaboradores (2017) avaliou infecção e colonização por um isolado de *E. coli* carreador de *mcr-1* de pacientes internados em dois hospitais. Os isolados de infecção positivos para *mcr-1* apresentaram resistência a um número maior de

antimicrobianos do que os isolados negativos para o gene, incluindo polimixinas, ertapenem, ciprofloxacina, entre outros. No entanto, resistência a imipenem e a meropenem não se diferenciou entre os dois grupos. Destacou-se também que dois isolados, um de infecção por *E. coli* ST-90 e outro de colonização de ST-744, eram coprodutores de *New Delhi Metallo-beta-lactamase* (NDM-1), além de possuírem genes de ESBLs, como TEM, SHV e CTX-M. Em paralelo, foram avaliados fatores de risco para infecção por *E. coli* carreador de *mcr-1*, dos quais o gênero masculino, imunossupressão ou ter recebido antibiótico nos 3 meses anteriores, em particular carbapenêmicos e fluoroquinolonas, foram significativos (WANG *et al.,* 2017). Já para colonização, os fatores de risco foram uso de antibiótico prévio a internação, mas durante não, e viver próximo a animais de produção (WANG *et al.,* 2017).

Há alguns surtos hospitalares de *mcr-1* reportados na Ásia e Europa. Na China, cinco crianças com leucemia aguda foram internadas com pneumonia durante dois meses na mesma enfermaria e receberam diferentes combinações de vancomicina, imipenem, lincomicina, cefotaxima, e um antifúngico. Destes pacientes foram obtidos 5 isolados de *K. pneumoniae* pertencentes ao ST-11 e um isolado de *E. coli* pertencente ao ST-156 resistentes a colistina, polimixina B, cefotaxima e gentamicina. Além disso, os isolados de *K. pneumoniae* também foram resistentes a outros antimicrobianos, incluindo fosfomicina e ciprofloxacina. Todos os 6 isolados carreadores de plasmídeo IncX4 contendo *mcr-1,* carreavam diferentes genes de resistência detectados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), como bla_{TEM-1} e $bla_{CTX-M-3}$(TIAN *et al.,* 2017).

Já em Portugal, de 16 pacientes, nove homens e sete mulheres entre 50 e 87 anos, internados em uma média de 47 dias (12-151 dias). Foram obtidos destes pacientes 24 isolados de *K. pneumoniae,* de colonização e infecção, produtores de carbapenemases, como $bla_{KPC-3,}$ que também eram carreadores de *mcr-1*. A CIM para colistina variou entre 4 e 8 mg/L, e exceto um isolado pertencente ao ST-1112, o restante era de ST-45, sendo que todos possuíam plasmídeo IncX4 como carreador do *mcr-1*. O estudo também observou colonização de trato gastrointestinal por Enterobactérias produtoras de carbapenemase e carreadoras de *mcr-1* em 5,7% (16/283) de pacientes

internados, dos quais 1,8% (5/283) evoluíram para infecção. Os pacientes que apresentaram infecção foram tratados com combinações de carbapenêmicos e colistina (MENDES *et al.,* 2018).

Recentemente, em coletas de água do mar de praias da costa de Algiers, Algéria, foram obtidos 246 isolados resistentes a colistina, sendo 244 de EIRC, e dois de *E. coli*, multirresistentes. Estes eram pertencentes ao ST-23 e ST-115, e apresentando CIM para colistina de 4 e 8 mg/L, respectivamente. Supondo que os achados teriam relação com as áreas em que foram encontrados, caracterizados pelo despejo sólido e líquido que tornam o local impróprio para nado, mas propícios para crescimento bacteriano e seleção de isolados multirresistentes (DRALI *et al.,* 2018).

A Figura 2 apresenta alguns estudos publicados especificando país, espécie e ST de isolados, tipos de plasmídeos carreadores de *mcr-1* e procedência de amostras. Desta forma, pode-se observar uma variedade de organismos portadores do gene, nem sempre ligada a pacientes com infecções nem em grandes quantidades de isolados.

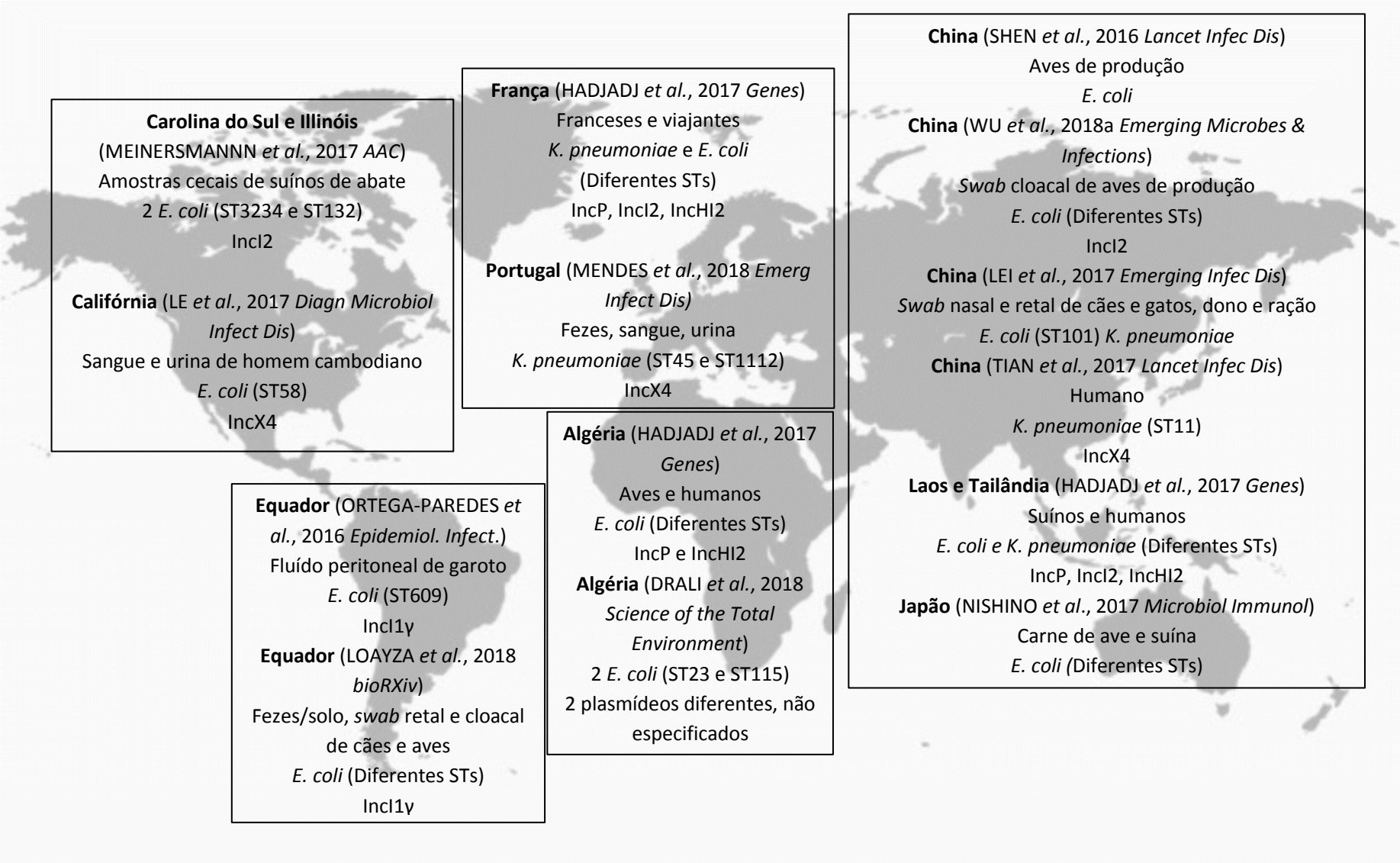


Figura 2 – Distribuição de relatos de *mcr* no mundo.

Além de isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli*, resistentes a colistina por mecanismos cromossomais adquirirem *mcr-1*, há dois casos reportados envolvendo EIRC apresentando também o gene, indicando possíveis reservatórios silenciosos do gene e a necessidade de estudos mais abrangentes (WANG *et al.,* 2018a; ZHANG *et al.,* 2017b).

Na China, três isolados de espécies diferentes possuíam o gene *mcr-3.10.* Na espécie *E. coli,* um plasmídeo IncI2 carreava-o, enquanto em *Aeromonas caviae* e *P. mirabilis* foi encontrado inserido em DNA cromossomal, todos obtidos de amostras cloacais do mesmo pato doméstico (WANG *et al.,* 2018a). Já Zhang e colaboradores (2017b), identificaram 9 isolados obtidos de lavado de moscas que possuíam *mcr-1*, sendo quatro de *E. coli*, dois de *P. stuartii*, dois de *P. alcalifens* e um de *Enterobacter cloacae*, cujas sequências eram similares entre si e com o *mcr-1* descrito por Liu e colaboradores (2016).

Dentre *Enterobacter spp.*, isolados de *E. cloacae* são os mais reportados como carreador de *mcr-1*, mas há poucos de *E. aerogenes* (reclassificado como *Klebsiella aerogenes*). Dois isolados de *K. aerogenes* com *mcr-1* foram identificados em pacientes infectados (WANG *et al.,* 2017). Sendo que após a conjugação, o transconjugante apresentou *mcr-1* e duas beta-lactamases (CTX-M-15 e TEM-1) no mesmo plasmídeo tipo IncFI (ZENG *et al.,* 2016).

1.6.3 Brasil

No Brasil, a primeira descrição de *mcr-1* foi em 2016, quando o gene foi identificado em um isolado de *E. coli* pertencente ao ST-101. O isolado foi obtido de uma amostra de tecido mole de um paciente do sexo masculino na sua segunda internação hospitalar, na região nordeste. Além de resistente a colistina, o isolado também era produtor de ESBL (CTX-M-8), pertencente ao ST-101 e continha plasmídeo IncX4 carreador do *mcr-1* (FERNANDES *et al.,* 2016a).

Em um estudo multicêntrico, foram analisados isolados de Enterobactérias triados em meio ágar MacConkey acrescido de colistina a 2

mg/L. Nesse estudo, houve crescimento de 515 isolados de um total de 4620 de amostras provenientes de animais, humanos, ração, comida e ambientais obtidas entre 2000 e 2016, de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (FERNANDES *et al.,* 2016b). Dezesseis isolados comensais de *E. coli* foram positivos para o gene *mcr-1* por PCR, divididos em dois isolados de amostras fecais de suínos em 2012, dos quais um era sensível a colistina (CIM de 1 mg/L) por método de diluição. E 14 de amostras fecais de aves de 2013 resistentes a colistina (CIM ≥ 8 mg/L), sendo que todos os animais eram saudáveis (FERNANDES *et al.,* 2016b). Demonstrou-se a presença do gene *mcr-1* no país desde 2012 e uma incidência relativamente alta de isolados coprodutores de ESBL do tipo CTX-M. Além de resistência a concentrações mais baixas de (4-16 mg/L), se comparado a mecanismos cromossomais, o que pode dificultar a detecção do gene (FERNANDES *et al.,* 2016b).

Dentre os isolados obtidos de amostras humanas até o momento, quatro de infecção (AIRES *et al.,* 2017; CONCEIÇÃO-NETO *et al.,* 2017; HIGASHINO *et al.,* 2018) e dois de colonização (DALMOLIN *et al.,* 2017a; DALMOLIN *et al.*, 2017b) foram reportados como coprodutores de KPC-2. Um paciente com infecção urinária por *K. pneumoniae* pertencente ao ST-392 foi tratado com combinação de polimixina B e meropenem, respondendo bem a terapia (AIRES *et al.*, 2017). Enquanto os outros pacientes não fizeram uso de colistina no tratamento da infecção ou não havia informação a respeito de uso prévio a coleta (CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2017; DALMOLIN *et al.*, 2017a; DALMOLIN *et al.*, 2017b).

Conceição-neto e colaboradores (2017) também relataram, além do paciente infectado por um isolado de *E. coli* de ST-167 *mcr-1* coprodutor de KPC-2, uma paciente que recebeu tratamento com meropenem e polimixina B, da qual foi isolado de *swab* retal *E. coli* de ST-354 carreador de *mcr-1* resistente a carbapenêmico, porém não por produção de KPC-2.

Em geral, o uso de colistina não aparece nos relatos de colonização, já outros antimicrobianos são descritos quando administrados de forma empírica ou como tratamento de infecção (FERNANDES *et al.*, 2016a; ROCHA *et al.*, 2017; AIRES *et al.*, 2017; CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2017; DALMOLIN *et al.*,

2017a; ROSSI *et al.*, 2017; DALMOLIN *et al.*, 2017b; LORENZONI *et al.*, 2018; NETO *et al.*, 2019).

No Hospital das Clínicas, em São Paulo, um estudo conduzido por Higashino e colaboradores (2018) relatou dois isolados de *K. pneumoniae* carreadores de *mcr-1* coprodutores de KPC-2 de pacientes internados na unidade de Transplante de Medula Óssea. Um isolado pertence ao ST-437, obtido em 2011, e outro ao ST-16, obtido em 2015, além de possuírem mutações cromossômicas nos genes *mgrB, pmrA* e *pmrC*.

Plasmídeos do tipo IncX4 são os mais frequentes no Brasil carreando *mcr-1* em isolados de *E. coli.* Esses plasmídeos podem disseminar rapidamente por serem considerados auto transmissíveis, estáveis e vantajosos ao *fitness* de seus hospedeiros (FERNANDES *et al.*, 2016a; WU *et al.*, 2018b). Além deste, o tipo IncI2, o mesmo observado por Liu e colaboradores (2016) na primeira descrição do gene, também é considerado vantajoso. Já o tipo IncHI2 exige maior manutenção afetando o crescimento bacteriano (WU *et al.*, 2018b). O Quadro 1 apresenta os estudos nacionais publicados até o momento destacando ano de publicação, local e tipo de amostra, a espécie da bactéria portadora e tipo de plasmídeo carreador.

Quadro 1 – Resumo de estudos de *mcr* no Brasil, referente a variante do gene, anos, locais e tipos de amostras identificados, espécie de isolados e tipo de plasmídeo carreador,até junho de 2019

Gene	Ano	Locais	Amostra	Espécie	Plasmídeo	Referência
mcr-1	2016	Nordeste	Tecido mole humano	*E. coli* (ST-101)	IncX4	FERNANDES *et al.*, 2016 *AAC*
mcr-1	2012-2013	Santa Catarina, Minas Gerais, Paraná e São Paulo	Fezes de suínos e aves	*E. coli*	Não identificados	FERNANDES *et al.*, 2016 *Euro Surveill*
mcr-1	2013	Costa Sudeste	Pata de pinguim infectada	*E. coli* (ST-10)	IncX4	SELLERA *et al.*, 2017 *JAC*
mcr-1	2016	São Paulo (SP)	Carne de ave	*E. coli* (ST-10, ST-48, ST-132, ST-522 e ST-4419)	IncX4	MONTE *et al.*, 2017a *AAC*
mcr-1	2016	Recife	Sangue humano	*E. coli* (ST-410)	IncX4	ROCHA *et al.*, 2017 *Int. J. of Antimicrob. Agents*
mcr-1	2016	São Paulo (SP)	Água do mar	*E. coli* (ST-10, ST-46 e ST-1638)	IncX4	FERNANDES *et al.*, 2017 *AAC*
mcr-1	2016	Vitória (SP	Urina humana	*K. pneumoniae* (ST-392)	IncX4	AIRES *et al.*, 2017 *AAC*
mcr-1	2015	Rio de Janeiro (RJ)	Sangue e *swab* retal humano	*E. coli* (ST-167 e ST-354)	IncX4	CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2017 *Int. J. of Antimicrob. Agents*
mcr-1	2016	São Paulo (SP)	Carne de ave	*E. coli* (ST-74 e ST-1850)	IncX4	MONTE *et al.*, 2017b *Genome Announc*
mcr-1	2014	Porto Alegre (RS)	*Swab* retal humano	*E coli* (ST-744)	IncX4	DALMOLIN *et al.*, 2017a *JAC*
mcr-1	2016	São Paulo (SP)	Sangue humano	*E. coli* (ST-156)	IncX4	ROSSI *et al.*, 2017 *Clinics*
mcr-1	2014	Porto Alegre (RS)	*Swab* retal humano	*K. pneumoniae* (ST-437)	IncX4	DALMOLIN *et al.*, 2017b Diagn *Microbiol Infect Dis*
mcr-3.12	2018	Minas Gerais	Diarreia de suíno	*E. coli* (ST-641)	IncA/C_2	KIEFFER *et al.*, 2018 *AAC*
mcr-1	2014	Nordeste	Fezes de bovino	*E. coli* (ST-443)	IncX4	PALMEIRA *et al.*, 2018 J *Glob Antimicrob Resist*
mcr-1	2017	Santa Maria, (RS)	Sangue humano	*E. coli*	Não especificado	LORENZONI *et al.*, 2018 *Braz J Infect Dis*
mcr-1	2011-2015	São Paulo	Sangue humano	*K. pnemuniae* (ST-437 e ST-16)	Não especificado	HIGASHINO *et al.*, 2018 *Bone Marrow Transplant*
mcr-1	2019	(residia na Paraíba)São Paulo	Cultura de vigilância retal e de orofaringe	*E. coli* (ST-744) *K. pneumoniae* (ST-101)	IncX4	NETO *et al.*, 2019 *Infection*

1.7 Bombas de efluxo

Outro mecanismo de resistência a colistina descrito é o efluxo do antimicrobiano através de bombas. As bombas de efluxo se dividem e cinco famílias: *resistance-nodulation-division* (RND); *major facilitator superfamily* (MFS); *ATP-binding cassette* (ABC); *small multidrug resistance* (SMR) e *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE). Com exceção da primeira família exclusiva de bactérias Gram-negativas, as quatro restantes podem ser encontradas em Gram-positivas também (SUN *et al.*, 2014).

Bombas da família RND compõem um sistema tripartido através das membranas interna e externa. E são associadas a multirresistência por não serem específicas a determinados antimicrobianos proporcionando maior chance de sobrevivência às bactérias (BLAIR *et al.*, 2014). Uma bomba RND muita estudada é a AcrAB-TolC. Os genes *acrA* e *acrB* codificam uma lipoproteína ancorada na membrana interna e uma proteína de membrana das bactérias Gram-negativas, respectivamente. Esse conjunto se liga a proteína TolC na membrana externa, formando o canal do meio intracelular para o extracelular (PADILLA *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2015). Além destes, o gene *acrR* atua como repressor de *acrA* e *acrB*, formando o operon. *acrRAB* (PADILLA *et al.*, 2010).

Este sistema AcrRAB-TolC está presente em muitas espécies de Enterobactérias e exerce um importante papel em isolados multirresistentes, assim como nas espécies que apresentam resistência intrínseca a colistina (LI *et al.*, 2015). Sua ação na resistência a colistina já foi descrita em várias Enterobactérias como *E. coli*, *K. pneumoniae, P. mirabilis, P. stuartii, M. morganii, E. asburiae, E. cloacae* e *K. aerogenes*, entre outras (LI *et al.*, 2015; BARON E ROLAIN, 2018).

A fim de avaliar a contribuição de bombas de efluxo na resistência bacteriana, pode ser comparada a CIM a um antimicrobiano sozinho com a CIM do antimicrobiano em combinação com um inibidor de bomba de efluxo (SEKYERE e AMOAKO, 2017). O carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) tem sido comumente utilizado em testes fenotípicos de ação de bombas

de efluxo. Por ser um protonóforo, o composto altera a permeabilidade da membrana ao alterar sua carga elétrica, além de reduzir a produção de ATP, necessário para o transporte ativo do antimicrobiano para o meio extracelular (SEKYERE e AMOAKO, 2017). No entanto, apenas o CCCP não tem ação bactericida, funcionando apenas como inibidor de bomba (NI *et al.*, 2016).

Ao testar 92 isolados resistentes a colistina, por diversos mecanismos, a CIM de colistina diminuiu tornando-se sensíveis ao antimicrobiano quando combinado ao CCCP, mesmo aqueles que apresentavam heterorresistência (BARON E ROLAIN, 2018). As EIRC, apresentaram diminuição da CIM de colistina, em média, 614 vezes menor. *Klebsiella spp.* portadoras de *mcr-1*, apresentaram CIM 64 vezes menor, em comparação com diminuição de 181 vezes da CIM de colistina de *Klebsiella spp.* com mutações cromossômicas (BARON E ROLAIN, 2018).

Apesar de resultados *in vitro* promissores do CCCP para combater o problema de Enterobactérias multirresistentes, o composto possui uma citotoxicidade alta para uso clínico, o que dificulta e limita o seu uso clínico (NI *et al.*, 2018).

2. Justificativa

Em março de 2016, foi identificado o primeiro caso no HC-FMUSP de uma paciente, sem histórico de uso de colistina, internada para tratamento de esquistossomose, da qual foi obtido um isolado de *E. coli* de uma amostra de urina, cujo antibiograma resultou como resistente à colistina e sensível aos carbapenêmicos. Das culturas de vigilância desta paciente obteve-se três isolados carreadores de *mcr-1*, *E. coli* e *K. pneumoniae* de amostras de vigilância de *swab* retal e outro isolado de *K. pneumoniae* da orofaringe. (NETO *et al.*, 2019). Desde esse primeiro relato, a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do Hospital das Clínicas implementou uma orientação que isolados que apresentem o mesmo perfil de sensibilidade deveriam ser testados para *mcr-1.* Estabelecendo que deveria ser realizada a coleta de cultura de vigilância dos contactantes de pacientes colonizados e/ou infectados por Enterobactérias carreadoras de *mcr-1* no intuito de avaliar a disseminação desse mecanismo de resistência no hospital. E indicada desde então precaução de contato para todos os pacientes colonizados e/ou infectados por bactérias carreadoreas de do gene *mcr-1*.

3. Objetivos

3.1 Principal

Investigar a disseminação de Enterobactérias resistentes à colistina carreadoras de *mcr*-1 a partir de pacientes com cultura de vigilância e/ou espécimes clínicos positivos para Enterobactéria resistente a colistina (caso) e para pacientes na mesma unidade (contactantes).

3.1 Secundários

-Avaliar as caraterísticas epidemiológicas e clínicas dos pacientes caso colonizados e/ou infectados por Enterobactérias resistentes a colistina carreadoras de *mcr*-1 e contactantes;

-Avaliar os mecanismos de resistência à colistina das bactérias Gram-negativas identificadas nas culturas de vigilância;

-Descrever os plasmídeos carreadores de *mcr-1*;

4. Materiais e Métodos

4.1 Local de estudo

O estudo foi desenvolvido no Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Foram incluídos pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) em São Paulo - SP.

O HC-FMUSP é um hospital público, terciário e universitário, conveniado ao Sistema Único de Saúde (SUS); constituído por seis institutos especializados e dois hospitais auxiliares, que somam cerca de 2.200 leitos, uma divisão de reabilitação e um hospital associado de atenção secundária. O Instituto Central dispõe de 24 enfermarias clínicas, doze enfermarias cirúrgicas e doze Unidades de Terapia Intensiva (UTI), abrangendo um total de 987 leitos.

Foram coletados *swabs* retais de vigilância de pacientes internados nas unidades: Pronto Socorro (PS), localizado no 4º andar, com 50 leitos fixos mais uma quantidade variável de macas, em que pacientes aguardam liberação de um leito; Unidade de Terapia Intensiva da Traumatologia (UP4C), localizada no 4º andar e dispõe de 17 leitos; Unidade do Pronto Socorro Cuidados Intensivos (UPSCI) localizada no 4º andar, como uma subdivisão do Pronto Socorro, e dispõe de 17 leitos.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa através da Plataforma Brasil como indicado no Anexo 1.

4.2 Dados clínicos

4.2.1 Definições

Caso – Paciente internado que apresentou infecção ou colonização por Enterobactéria resistente a colistina e sensível a carbapenêmico em cultura de vigilância e permaneceu em precaução de contato após o resultado.

Contactante – Paciente internado que esteve na mesma unidade que o paciente caso e no mesmo período.

Critérios de inclusão:

-Pacientes internados maiores de 18 anos

-Paciente classificado como caso

-Pacientes classificado como contactante

Não houve critérios de exclusão.

Foram identificados quatro pacientes classificados como caso, cujas características são apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Características dos quatro pacientes classificados como caso. Os isolados destas amostras não foram inclusos no presente trabalho

CASO	A	B	C	D
Unidade	PS	UP4C	UP4C	UPSCI
Data de infecção	31/08/2016	12/09/2016	17/12/2016	02/01/2017
Amostra clínica	Sangue periférico	Sangue periférico	Secreção traqueal	Sangue periférico
Espécie	*K. pneumoniae*	*E. cloacae*	*K. aerogenes*	*K. pneumoniae*
Hospitalização até infecção	11 dias	116 dias	14 dias	20 dias
Colistina	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥16 R
Imipenem	≤0,25 S	≤0,25 S	1 S	≤0,25 S
Meropenem	1 S	≤0,25 S	≤0,25 S	≤0,25 S
Ertapenem	4 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≤0,5 S
Investigação de *mcr-1*	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo

Legenda: PS – Pronto Socorro; UP4C – UTI da Traumatologia; UPSCI – Unidade de Cuidados Intermediários do Pronto Socorro.

4.2.2 Coleta de dados clínicos

Por meio das plataformas Si3 e HCMED, foram consultados os prontuários eletrônicos dos pacientes para coleta de dados referentes à uso de antimicrobianos durante internação, período e permanência em cada unidade.

4.3 Coleta e processamento de amostras clínicas

Foram coletados *swabs* retais de pacientes contactantes de quatro casos de infecção no período de setembro de 2016 a janeiro de 2017 e encaminhados para o Laboratório de Investigação Médica – 49 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O processamento ocorreu de acordo com a Figura 3, e cada atividade foi detalhada a seguir.

As amostras coletadas foram de colonização, incluindo dos casos índice. As amostras clínicas dos pacientes caso não foram incluídas no trabalho por não armazenamento do laboratório de rotina.

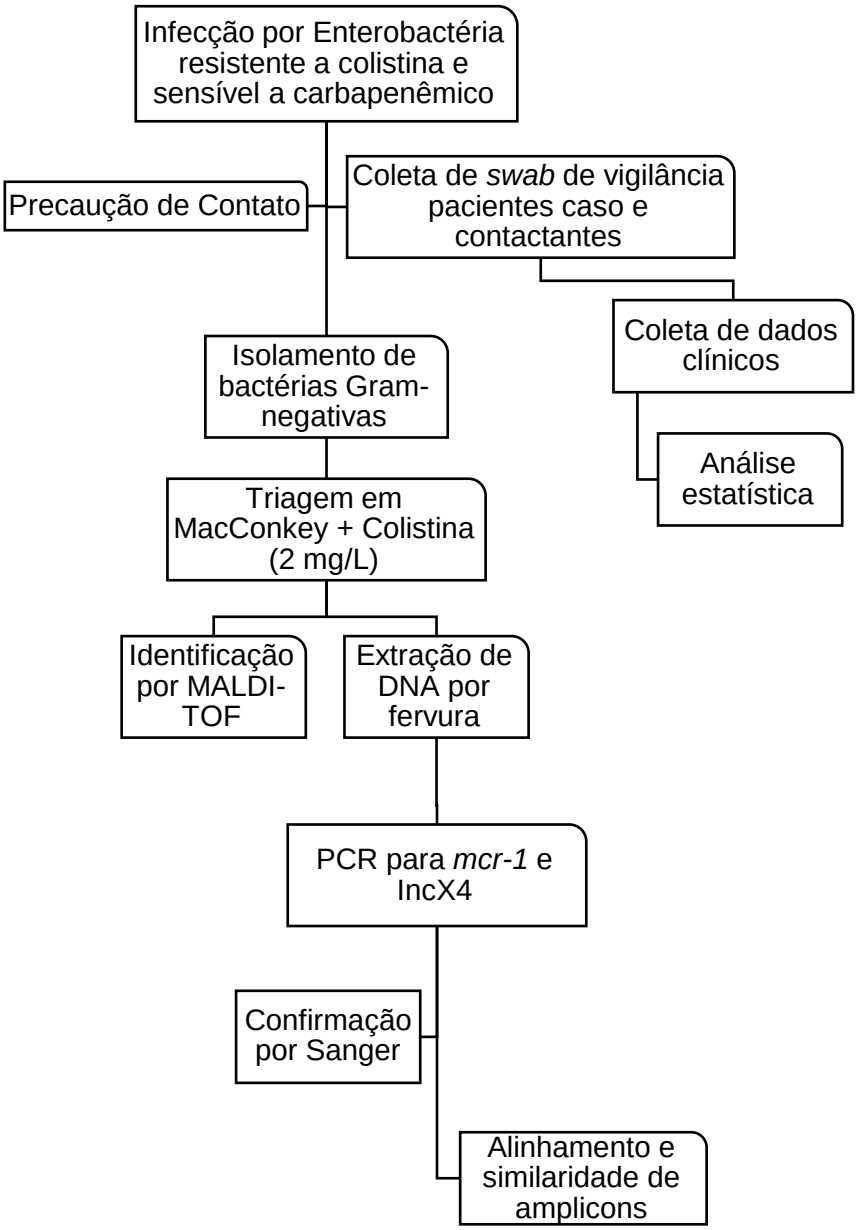


Figura 3 – Fluxo de trabalho desde notificação de caso à identificação de isolados positivos para *mcr-1* por PCR.

4.4 Isolamento de bactérias

As amostras foram semeadas diretamente em meio ágar MacConkey para crescimento de bactérias Gram-negativas. Amostras que apresentaram crescimento de isolados fermentadores e não fermentadores de lactose, tiveram os mesmos reisolados em novas placas de ágar MacConkey e trabalhados

separadamente. Em casos de dúvidas para colônias igualmente fermentadoras ou não, porém visualmente divergentes, foi realizado reisolamento e identificação de ambas. Os isolados obtidos foram triados em meio ágar MacConkey acrescido de colistina à 2 mg/L (EUCAST, 2018) testados paralelamente com cepas ATCC sensíveis a colistina.

4.5 Identificação dos isolados

Colônias dos isolados foram inoculadas separadamente em caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Difco) incubado a 37ºC por 24 horas. Uma alíquota desse cultivo foi centrifugada a 5.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300µl de água ultrapura e 900µl de etanol ao sedimento, agitou-se e em seguida os tubos foram centrifugados a 13.000g por 2 minutos. Após descarte do sobrenadante, os sedimentos secaram por evaporação a temperatura ambiente. Aos sedimentos, foram adicionados 50µl de ácido fórmico (70%) e 50µl de acetonitrila (100%). A mistura foi novamente centrifugada a 13.000g por 2 minutos e o sobrenadante foi transferido para um microtubo novo e armazenado a -20°C.

Foi utilizado o espectrofotômetro de massa Microflex™ (BrukerDaltonik) da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB. Para leitura, 1µl de suspensão proteica foi transferido para a placa de aço inox de 96 poços. Após secagem em temperatura ambiente, foi adicionado sobre a amostra 1µl da matrix (ácido α-ciano-4-hidróxido-cinamico). Cada estirpe foi distribuída em dois poços (duplicata) e para cada placa foram realizadas duas leituras. Para captura dos espectros proteicos foi utilizado o programa FlexControl™ (BrukerDaltonik) pelo método MTB_autoX. O espectrofotômetro foi externamente calibrado com a utilização de proteínas ribossômicas de Escherichia coli (BTS - BrukerDaltonik).

Para a identificação bacteriana pelo espectro proteico foi utilizado o programa BioTyper™ (MALDI Biotyper CA Systems) 3.0 (BrukerDaltonik) a partir do qual foi realizada uma comparação dos espectros capturados para cada estirpe com a biblioteca do fabricante. Desta comparação de presença/ausência

de picos específicos por gênero e espécie bacteriana, obteve-se um valor de escore (log (score) value). Os critérios para interpretação dos padrões da fabricante BrukerDaltonik foram utilizados neste estudo como segue: escores ≥ 2.0 foram aceitos para atribuição de espécie, e escores ≥ 1.7 e < 2.0 foram utilizados para identificação de gênero.

4.6 Extração de DNA por método de fervura

Todos os isolados que cresceram em meio ágar MacConkey com colistina foram submetidos à extração de DNA por fervura de acordo com o seguinte protocolo: adicionando-se uma alçada do isolado, crescido em ágar, em solução contendo 10µL de EDTA 0,1M, 1µL de Tris 1M de pH 7,0, 84µL de água MilliQ estéril e 5µL de Lisozima 20 mg/mL. A solução foi homogeneizada utilizando-se agitador e incubada a 37°C por trinta minutos, para ação da lisozima. Em seguida, foi incubada a 100°C por dez minutos para quebra da parede celular. Após esfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 400µL de água MilliQ estéril também à temperatura ambiente e homogeneizado novamente com agitador. O DNA foi separado no sobrenadante após centrifugação à 13.000rpm por dez minutos à temperatura ambiente e passado para um novo tubo de centrifugação estéril. E foi armazenado à -20°C por, no mínimo, 24 horas para estabilização prévia ao uso.

4.7 Identificação de gene *mcr-1* e plasmídeos tipo IncX4

Foi realizada Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os primers CLR5-F e CLR5-R. Quando positivos, também foi realizado PCR para o gene *mcr-1* e X4-F e X4-R para os plasmídeos tipo IncX4 (Quadro 3).

Quadro 3 – Sequências dos primers utilizados, tamanho esperado de amplicons e alvos

Primers	Sequências	Alvo	Tamanho do Amplicon (pb)	Referência
CLR5-F *CLR5-R*	5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3' 5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3'	Gene *mcr-1*	309	LIU *et al.*, 2016
X4-F *X4-R*	5'-GCAAACAGGGAAAGGAGAAGACT-3' 5'-TACCCCAAATCGTAACCTG-3'	Gene *taxC*	569	JOHNSON *et al.,* 2012

Para amplificação do gene *mcr-1* foram utilizados seguintes parâmetros: 7 minutos inicias à 94ºC; 40 ciclos de: 50 segundos à 94ºC, 50 segundos à 53ºC, 1 minuto e 30 segundos à 72ºC; seguidos de 10 minutos finais à 72ºC, adaptada do protocolo de Cavaco e colaboradores (2016).

Para amplificação do gene *taxC*, pertencente à estrutura básica de plasmídeos do grupo IncX, específico para o subgrupo IncX4 foram utilizados seguintes parâmetros: 4 minutos iniciais a 95ºC; 30 ciclos de: 30 segundos à 95ºC, 30 segundos à 60ºC, 1 minuto à 72ºC; seguidos de 5 minutos finais à 72ºC, adaptada do protocolo de Johnson e colaboradores (2012).

Após amplificação, foi feita visualização de bandas em gel de agarose à 2% com 5µL de SybrSafe® e amostras coradas com BlueJuice®.

A confirmação da presença do gene *mcr-1* foi realizada pelo método de sequenciamento Sanger utilizando MegaBACE 1000 (ABI 3730 DNA Analyser; Applied Biosystems, Alameda, CA), no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, e analisado através do programa BioEdit (Hall, 1999) e Blast® (NCBI).

4.8 Amostras positivas para o gene *mcr-1* por PCR

As amostras que foram positivas para o gene *mcr-1* pela técnica de PCR foram processadas de acordo com a Figura 4 e cada passo foi descrito abaixo.

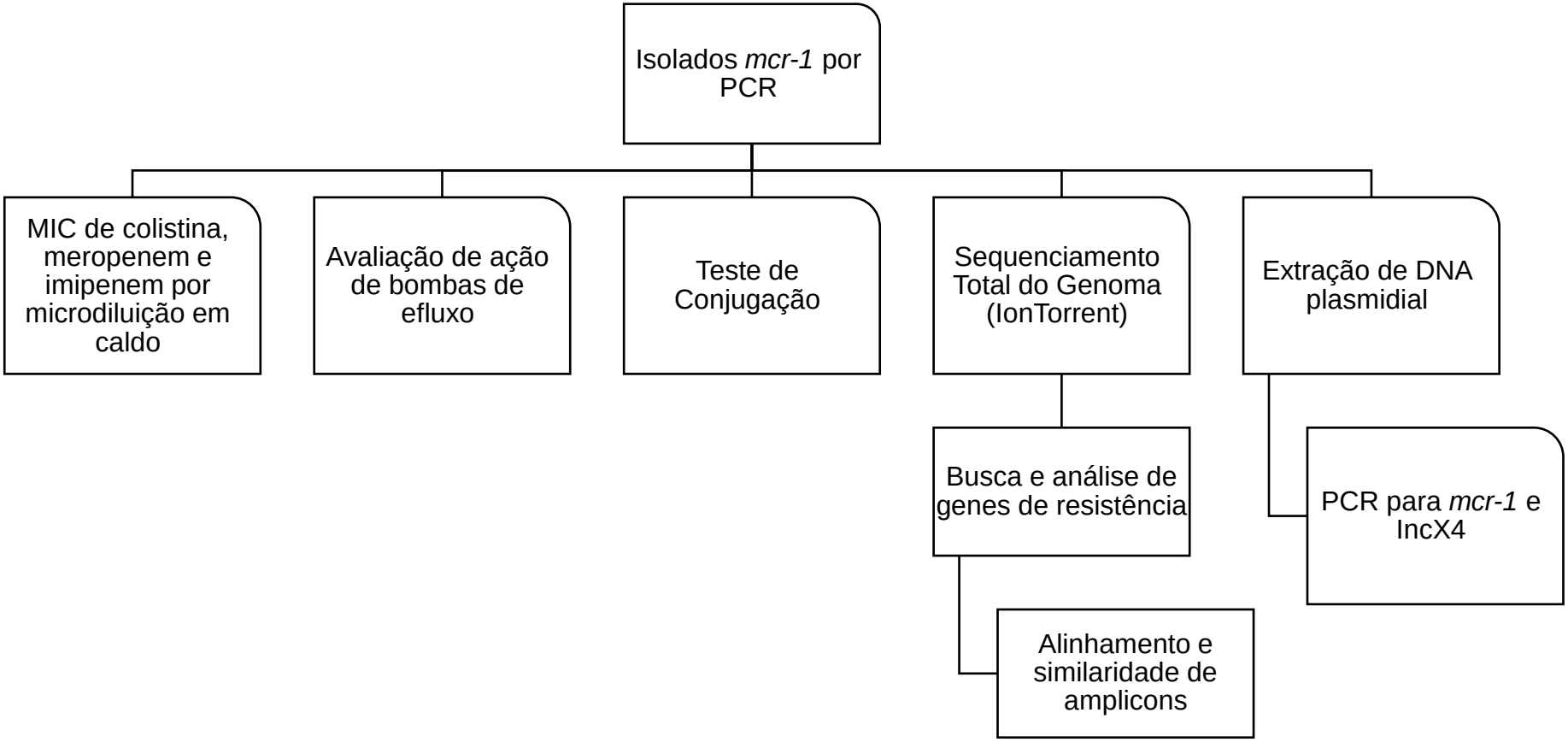


Figura 4 – Experimentos realizados nos isolados positivos para *mcr-1* por PCR.

4.8.1 Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foi realizada microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima para imipenem e meropenem de acordo com os parâmetros do *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI) (2018). Para colistina, foi utilizado mesmo método, utilizando o ponto de corte do EUCAST (2018) de CIM ≤ 2 mg/L sensível e CIM > 2 mg/L resistente.

A leitura dos resultados foi realizada por mais de um observador.

4.8.2 Avaliação de ação de bombas de efluxo

Para determinação da ação de bombas de efluxo na resistência à colistina, foi realizado microdiluição em caldo de acordo com os parâmetros do CLSI (2018) com modificações.

Foi utilizada concentração final do inibidor de bombas de efluxo CCCP igual a 10 mg/L (BARON e ROLAIN, 2018) em todos os poços que continham colistina, independente de sua concentração. Cada amostra foi testada em duplicata e comparada com sua CIM de colistina sem CCCP, realizada em paralelo.

Foi considerado ação de bomba de efluxo quando a CIM para colistina diminuiu no mínimo 8 vezes (4 concentrações a menos) em presença de CCCP em relação ao antimicrobiano sozinho (BARON e ROLAIN, 2018).

4.8.2 Conjugação

Para avaliação da transmissibilidade do gene *mcr-1* foi realizado teste de conjugação. Foram utilizadas cepas receptoras $C600^{STR}$ (LIU *et al.*, 2016), uma *E. coli* não fermentadora de lactose e resistente à estreptomicina e sem plasmídeo; e $J53^{AZD}$ (ZHANG *et al.,* 2017a), também *E. coli*, mas fermentadora de lactose e resistente à azida sódica e também sem plasmídeo. A cepa receptora para cada amostra variou, optando pela cepa $C600^{STR}$ para os isolados fermentadores de lactose, e pela cepa $J53^{AZD}$ para isolados não fermentadores de lactose devido a diferenciação visual das colônias em ágar MacConkey.

O protocolo foi adaptado de CUNHA (2018). As cepas foram crescidas previamente em meio ágar MacConkey acrescido de colistina à 2 mg/L a 37°C por até 24 horas. Com exceção das cepas receptoras que foram crescidas em ágar sem antimicrobiano. Com alça estéril, duas a três colônias foram inoculadas em 2 mL de meio Luria Bertani (LB) e incubadas à 37°C de duas a quatro horas. As cepas receptora e doadora foram inoculadas em 4 mL de meio LB na proporção de 2:1 e incubadas à 37°C.

Durante incubação da mistura, foi realizada inoculação da mesma em placas de ágar MacConkey acrescidos de colistina à 2 mg/L e de estreptomicina à 2g/L, no caso da cepa $C600^{STR}$, ou de azida sódica à 0,3g/L, no caso da cepa $J53^{AZD}$. Os intervalos de incubação utilizados foram 18 e 24 horas.

Quando houve crescimento de colônias da cepa receptora nas placas contendo dois antimicrobianos, foi realizado repique em novas placas de ágar MacConkey contendo colistina à 2 mg/L para extração de DNA pelo método de fervura e confirmação de conjugação do gene *mcr-1* por PCR.

4.8.3 Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial foi realizada através do Kit QIAprep® Spin Miniprep da QIAGEN com alterações. O protocolo foi modificado para substituir a coluna, a fim de não quebrar o DNA excessivamente. A purificação foi realizada adicionando-se 600µL de Isopropanol, armazenado a -80ºC, ao sobrenadante que iria para a coluna, seguido de uma centrifugação de 5 minutos a 13000 rpm à 4ºC. Depois o sobrenadante foi descartado, e o sedimento lavado com 1 mL de etanol a 70%, também armazenado à -80ºC, e centrifugado por 2 minutos a 13000 rpm à 4ºC. O sobrenadante foi descartado novamente e o sedimento deixado para secar por evaporação no fluxo laminar. Por último, foi realizada eluição do DNA com 50µL do tampão Buffer EB, do Kit, à 70ºC.

O DNA plasmidial extraído foi utilizado em PCR para busca do gene *mcr-1* no material extracromossomal, e para o gene *taxC* característico de plasmídeos tipo IncX4.

4.8.4 Sequenciamento Total de Genoma (WGS)

Foi realizada extração de DNA total por kit comercial QiAamp DNA mini kit – Qiagen a partir de cultura em placa de ágar MacConkey incubado à 36°C de 18 a 24 horas.

Os processos para o preparo de amostras foram: preparo de biblioteca, seleção de fragmentos de 200pb por E-Gel® (Life Technologies, EUA), PCR em emulsão, carregamento de amostras em 2 chips com auxílio do sistema *Ion Chef™* (Thermo Fischer Scientific, EUA) e sequenciamento pela plataforma *Ion Proton™ System,* cujo aparelho faz parte do sistema de multiusuários da Rede PREMIUM da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP).

Os arquivos gerados foram avaliados pelos programas FastQC v 0.11.3 e Trimmomatic v. 0.33, e a montagem do genoma foi realizada utilizando o programa Spades v. 3.5.0, utilizando também a opção 'Plasmid' para extração de *reads* de plasmídeos. Os *contigs* foram ordenados pelo Abacas v. 1.3.1, anotados com o Prokka v. 1.11 e visualizados com o Artemis v. 16.0.11.

Os arquivos montados também foram lançados em plataformas online do *Center for Genomic Epidemiology* em busca de genes de resistência adquirida, tipos de plasmídeos, *Multi Locus Sequence Type* (MLST) e genes de virulência nas bases de dados: ResFinder (ZANKARI *et al.,* 2012), PlasmidFinder (CARATTOLI *et al.,* 2014), MLSTFinder (*LARSEN et al.,* 2012) e VFDB (LIU *et al.,* 2019), respectivamente. Também foi utilizada a plataforma *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) (JIA *et al.,* 2017) para busca de genes de resistência e de bombas de efluxo.

A curadoria foi realizada manualmente para verificação de melhor identidade de genes entre as plataformas através da ferramenta Artemis v. 16.0.11.

4.8.5 Análise de genes de resistência cromossomal à colistina

Os genes de resistência cromossomal à colistina destacados no Quadro 4 foram avaliados de acordo com a espécie para presença, ausência e

mutações. Foram inclusos genes codificadores de estruturas do lipídeo A, fosfoetanolaminas transferases (PEtN) e de bombas de efluxo.

Quadro 4 – Genes cromossomais de resistência a colistina

Gene	Espécies
mgrB	*K.pneumoniae K. aerogenes P. mirabilis P. stuartii M. morganii*
phoP	*K.pneumoniae K. aerogenes P. mirabilis P. stuartii M. morganii*
phoQ	*K.pneumoniae K. aerogenes P. mirabilis P. stuartii M. morganii*
pmrA	*K. pneumoniae K. aerogenes*
pmrB	*K. pneumoniae K. aerogenes*
cptA[1]	*P. stuartii*
eptA[1]	*K. pneumoniae K. aerogenes M. morganii*
eptB[1]	*K. pneumoniae K. aerogenes M. morganii*
eptC[1]	*P. mirabilis*
arnB	*K.pneumoniae K. aerogenes P. mirabilis P. stuartii M. morganii*
arnC	*K.pneumoniae K. aerogenes P. mirabilis P. stuartii M. morganii*
arnA	*K.pneumoniae K. aerogenes P. mirabilis P. stuartii M. morganii*
arnT	*K.pneumoniae K. aerogenes P. mirabilis P. stuartii M. morganii*
crrB	*K. pneumoniae*
AcrRAB-TolC[2]	*K.pneumoniae K. aerogenes P. mirabilis P. stuartii M. morganii*

Legenda: 1 – PetN; 2 – Bombas de efluxo

4.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa Epi Info™ ver. 7.2.2.16 (CDC) (DEAN *et al.,* 2011) com os dados clínicos coletados dos prontuários eletrônicos e detecção do gene *mcr-1* por PCR. Os fatores de risco de aquisição de *mcr*-1 dos contactantes foram avaliados em um modelo de análise univariada. Variáveis categóricas foram avaliadas usando o teste de Fisher e ou T-Student e para as variáveis contínuas o teste de Wilcoxon, considerando significativo o valor de $p < 0,05$. As variáveis significativas e com plausibilidade biológica foram colocadas em um modelo de regressão logística.

4.10 Alinhamento e similaridade de amplicons

Para os amplicons sequenciados pela plataforma Sanger e correspondentes ao gene *mcr-1* pela ferramenta Blast® (NCBI), foi realizado alinhamento das entre as sequências de nucleotídeos com o MUSCLE através da ferramenta Jalview (WATERHOUSE *et al.,* 2009). A similaridade entre os amplicons foi determinada através do programa BioEdit (Hall, 1999), com a opção '*Sequence Identity Matrix'*. Os alinhamentos foram gerados pela plataforma ESPript 3.0 (ROBERT e GOUET, 2014).

As mesmas ferramentas foram utilizadas para alinhar o gene *mcr-1* (LIU *et al*., 2016), PEtN e outras sequências identificadas como *mcr-1* ou suas variantes pela Plataforma CARD, quando utilizada opção '*Loose Hits'* agrupando-se por isolado. Quando não houve alinhamento de amplicon com nenhum dos genes testados, foi realizada tentativa de mapeamento dos amplicons com os fragmentos obtidos do sequenciamento total do genoma para avaliar amplificação inespecífica.

A similaridade foi calculada para avaliar a possibilidade de amplificação de gene codificador de PEtN não *mcr*-1. Similaridade Bruta se refere ao valor gerado pelo programa BioEdit (HALL, 1999) e para Similaridade Equivalente foi realizado cálculo, como apresentado na Figura 5, de proporção do valor bruto quando comparado ao fragmento correspondente, de mesmo tamanho, do gene *mcr-1*.

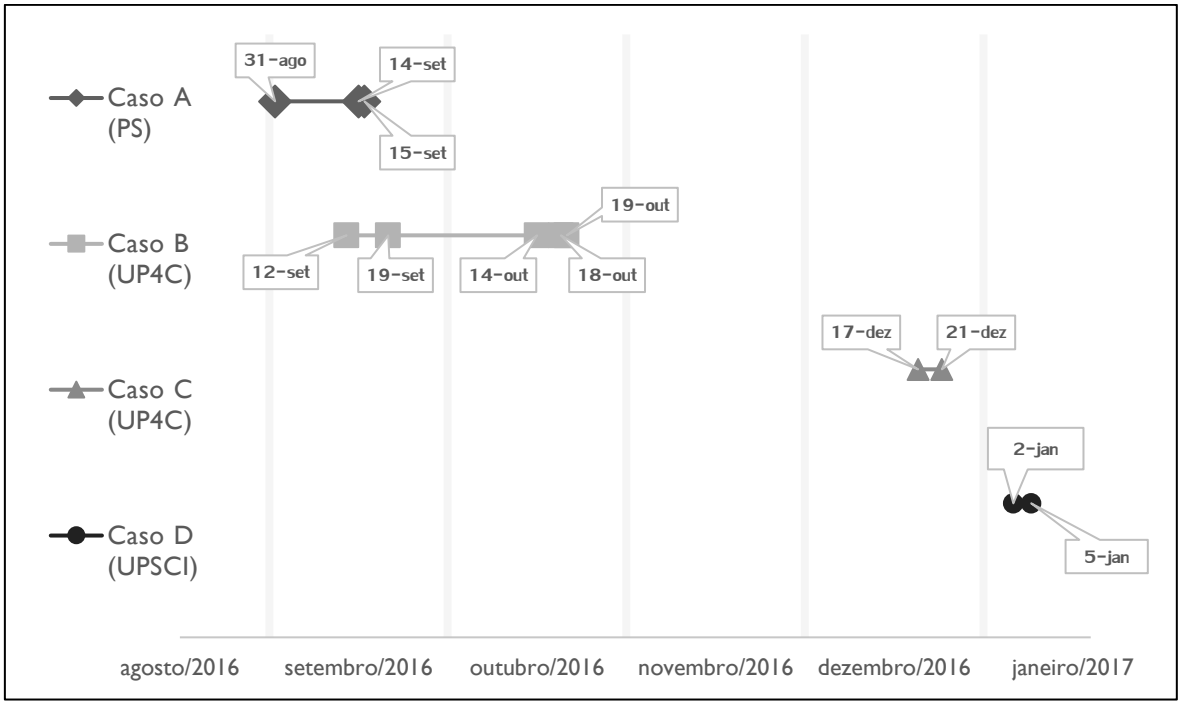
$$\text{Similaridade Bruta (\%)} \quad X \left\{ \frac{\text{Fragmento ou gene maior (pb)}}{\text{Fragmento ou gene menor (pb)}} \right\} = \text{Similaridade Equivalente (\%)}$$

Figura 5 – Fórmula para cálculo de similaridade equivalente a partir de similaridade bruta obtida por comparação de alinhamento entre fragmentos do PCR com o fragmento alvo do gene *mcr-1*, pelo programa BioEdit (HALL, 1999)

Para avaliação de relação entre os amplicons, foi construída uma árvore filogenética baseada nas sequências de nucleotídeos através do programa MEGA-X versão 10.0.5 (KUMAR *et al.*, 2018) pelo método de máxima verossimilhança (*maximum likelihood method*).

5. Resultados

As coletas dos *swabs* retais dos pacientes ocorreram em dias variados após identificação do paciente caso (colonizado e/ou infectado por Enterobactérias resistentes a colistina): paciente A no dia 31 de agosto de 2016 no Pronto Socorro; paciente B no dia 12 de setembro de 2016 na UTI da Traumatologia; paciente C no dia 17 de dezembro novamente na UTI da Traumatologia e paciente D no dia 2 de janeiro de 2017 na Unidade de Cuidados Intermediários do Pronto Socorro. A Figura 6, exibe as datas de identificação dos casos e respectivas coletas de contactantes (pacientes internados no mesmo período e unidade do caso).



Legenda: PS – Pronto Socorro; UP4C – UTI da Traumatologia; UPSCI – Unidade de Cuidados Intermediários do Pronto Socorro.

Figura 6 – Intervalo de tempo entre identificação do caso (colonizado e/ou infectado por Enterobactérias resistentes a colistina) indicado pela primeira data, e coletas das amostras de *swab* retal dos pacientes contactantes (internados no mesmo período e unidade do caso) indicados pelas datas seguintes.

5.1 Pacientes

No total, foram coletadas amostras de *swab* retal de 48 pacientes, 4 casos e 44 contactantes identificados em 3 unidades (PS – Pronto Socorro, UP4C – UTI da Traumatologia e UPSCI – Unidade de Cuidados Intermediários do Pronto Socorro) durante o período de agosto de 2016 a janeiro de 2017. Dos quatro casos, o primeiro, caso A (PS) foi negativo na investigação de *mcr-1,* assim como seus 25 contactantes. O caso B, identificado em 12 setembro na UP4C, caso C, identificado em 17 de dezembro também na UP4C e caso D, identificado em 2 de janeiro de 2017 na UPSCI, foram positivos para *mcr-1*. Entre os contactantes, 13, 5 e 2, respectivamente, 4 apresentaram colonização por isolado carreador de *mcr-1*. Do total de 20 pacientes contactantes dos casos B, C e D, a média de idade ficou na faixa dos 50 anos e nenhum dos casos tinha mais que 65 anos. A média de dias de internação dos casos foi de 54 dias, enquanto a dos contactantes foi de 28 dias antes da coleta de amostras. Todos (100%) dos casos apresentaram isolados de colonização resistente a colistina e fizeram uso de, no mínimo, colistina e meropenem prévio à coleta, e foram submetidos a alguma cirurgia. Já o uso pelos contactantes foi menor, 10 (50%) de colistina e 6 (30%) de meropenem, e a doença de base mais frequente foi trauma ou fratura de 13 (65%) dos pacientes contactantes. O tempo de contato médio entre contactantes e respectivos casos foi de 10 dias. Outros dados demográficos e clínicos dos 23 pacientes estão apresnetados da Tabela 1 e dados específicos de todos os 48 pacientes coletados estão apresentados no Anexo 2.

Tabela 1 – Perfil de 23 pacientes estudados, incluindo 3 casos (colonizados e/ou infectados por Enterobactérias resistentes a colistina e sensíveis a carbapenêmicos) e 20 contactantes (pacientes que estiveram na mesma unidade e período que o caso)

Características	Casos N=3	Contactantes N=20	Pacientes Total (n=23)
Gênero Masculino	1 (33,3%)	12 (60%)	13 (56,5%)
Idade (anos)			
Média	58 (57 - 60)	51 (22 - 78)	52 (22 - 78)
Desvio Padrão	1,5	16,9	15,9
Idade >65 anos	0	4 (20%)	4 (17,4%)
Tempo hospitalização total (dias)			
Média	103 (37 - 151)	28 (6 - 115)	38 (6 - 151)
Mediana	136	23	28
Desvio Padrão	59,2	23,8	38,4
Tempo hospitalização prévio a coleta (dias)			
Média	54 (19 - 120)	16 (4 - 47)	21 (4 - 120)
Mediana	24	12	16
Desvio Padrão	56,9	14	25,1
Tempo de contato prévio a coleta (dias)			
Média	N/A	10 (2 - 28)	N/A
Desvio Padrão	N/A	7,7	N/A
Colonização por Col-R	3 (100%)	4 (20%)	7 (30,4%)
***mcr-1* por PCR**	3 (100%)	4 (20%)	7 (30,4%)
Doenças de Base			
Câncer	2 (66,7%)	0	2 (8,7%)
Cardíacas	0	2 (10%)	2 (8,7%)
Cirurgia	3 (100%)	5 (25%)	8 (34,8%)
Diabetes *mellitus*	0	2 (10%)	2 (8,7%)
Doenças infecciosas	1 (33,3%)	6 (30%)	7 (30,4%)
Gastrointestinais	1 (33,3%)	5 (25%)	6 (26,1%)
Hipertensão	0	1 (5%)	1 (4,3%)
Insuficiência renal	0	1 (5%)	1 (4,3%)
Neurológicas	2 (66,7%)	5 (25%)	7 (30,4%)
Trauma/Fratura	1 (33,3%)	13 (65%)	14 (60,9%)
Uso Drogas/Álcool	0	2 (10%)	2 (8,7%)
Vasculares (Exceto Hipertensão)	0	3 (15%)	3 (13%)
Outras	0	4 (20%)	4 (17,4%)
Uso de ATM prévio a coleta	3 (100%)	10 (50%)	13 (56,5%)
Ciprofloxacina	1 (33,3%)	4 (20%)	5 (21,7%)
Tempo médio de uso de ciprofloxacina (dias)	0 - 26	1 (0 - 11)	2 (0 - 26)
Colistina	3 (100%)	10 (50%)	13 (56,5%)
Tempo médio de uso de colistina (dias)	18 (10 - 33)	4 (0 - 22)	6 (0 - 33)
Meropenem	3 (100%)	6 (30%)	9 (39,1%)
Tempo médio de uso de meropenem (dias)	6 (1 - 11)	2 (0 - 15)	2 (0 - 15)
Piperacilina+Tazobactam	1 (33,3%)	0	1 (4,3%)
Tempo uso de pieracilina+tazobactam (dias)	0 - 9	0	0 - 9
Óbito	3 (100%)	9 (45%)	12 (52,2%)

Legenda: N/A – Não aplicável. Col-R – Resistente a colistina. Outras doenças incluem: choque não especificado, insuficiência respiratória aguda, pneumotórax, transtornos do diafragma, hemotórax, transplante hepático e efeitos de corrente elétrica. ATM – Antimicrobianos.

Além de ciprofloxacina, colistina, meropenem e piperacilina+tazobactam outros antimicrobianos utilizados antes da coleta de amostras foram anidulafungina, fluconazol, gentamicina, imipenem+cilastatina sódica e vancomicina.

Na análise univariada de fatores de risco para aquisição do gene *mcr-1*, tempo de hospitalização até a coleta de amostra, ter sido submetido a cirurgia, uso e duração do tratamento com meropenem foram significativos. O uso de colistina apresentou tendência a fator de risco, ao passo que tempo de uso de colistina foi um fator de risco para aquisição de *mcr-1* (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise bivariada de fatores de risco associados a aquisição do gene *mcr-1* por pacientes internados no HC-FMUSP identificados entre setembro de 2016 a janeiro de 2017

Variáveis	Pacientes positivos para *mcr-1* (n=7)	Pacientes negativos para *mcr-1* (n=16)	RR (IC 95%)	*p*
Gênero masculino	3 (42,8%)	10 (62,5%)	1 (0,7 - 1,6)	0,63
Idade (média)	49 (22 - 60)	54 (30 - 78)	N/A	0,47
Idade > 65 anos	0	4 (25%)	0,74 (0,56 - 0,96)	0,20
Tempo hospitalização prévio a coleta (dias)	38 (14 - 124)	14 (4 - 47)	N/A	0,02
Tempo de contato prévio a coleta (dias)	13 (3 - 17)	10 (2 - 28)	N/A	0,18
Colonização por Col-R	1 (14,3%)	1 (6,2%)	1,4 (0,35 - 5,9)	0,52
Doenças de Base				
Câncer	2 (28,6%)	0	Indefinido	0,08
Cardíacas	0	2 (12,5%)	0,66 (0,49 - 0,9)	0,47
Cirurgia	4 (57,1%)	4 (25%)	2,3 (0,92 - 5,7)	0,02
Diabetes *mellitus*	0	2 (12,5%)	0,66 (0,49 - 0,9)	0,47
Doenças infecciosas	5 (71,4%)	1 (6,2%)	0,96 (0,54 - 1,7)	0,64
Gastrointestinais	2 (28,6%)	4 (25%)	1 (0,55 - 2)	0,61
Hipertensão	0	1 (6,25%)	0,68 (0,51 - 0,9)	0,69
Insuficiência renal	0	2 (12,5%)	0,66 (0,49 - 0,9)	0,47
Neurológicas	4 (57,1%)	3 (18,7%)	1,9 (0,78 - 4,6)	0,09
Trauma/Fratura	4 (57,1%)	10 (62,5%)	0,9 (0,52 - 1,6)	0,58
Uso Drogas/Álcool	0	2 (12,5%)	0,66 (0,49 - 0,9)	0,47
Vasculares (Exceto Hipertensão)	2 (28,6%)	1 (6,2%)	2,2 (0,44 - 11)	0,20
Outras	2 (28,6%)	1 (6,2%)	2,2 (0,44 - 11)	0,20
Uso de ATM prévio a coleta	6 (85,7%)	8 (50%)	1,5 (0,93 - 2,6)	0,12
Ciprofloxacina	2 (28,6%)	3 (18,7%)	1,2 (0,55 - 2,6)	0,49
Tempo médio de uso de ciprofloxacina (dias)	5 (0 - 26)	1 (0 - 10)	N/A	0,43
Colistina	6 (85,7%)	7 (43,7%)	1,7 (0,97 - 2,9)	0,07
Tempo médio de uso de colistina (dias)	11 (0 - 33)	3 (0 - 22)	N/A	0,02
Meropenem	6 (85,7%)	3 (18,7%)	2,8 (1,1 - 7,1)	0,004
Tempo médio de uso de meropenem (dias)	6 (0 - 12)	1 (0 - 15)	N/A	0,003
Piperacilina+ Tazobactam	1 (14,3%)	0	Indefinido	0,30
Tempo uso de pieracilina+tazobactam (dias)	0 - 9	0	N/A	0,13

Legenda: RR – Risco relativo. IC – Intervalo de confiança. N/A – Não aplicável.

Na análise multivariada, as variáveis não foram significativas quando avaliadas em conjunto (a). Analisando apenas variáveis de uso de colistina e meropenem (b), o segundo continuou como fator de risco. Avaliando cirurgia e tempo de internação prévio a coleta (c), ter sido submetido a alguma cirurgia

continuou fator de risco, e quando comparado juntamente a uso dos dois antibióticos (d), apenas uso de meropenem foi significativo (Tabela 3). Outras combinações de variáveis não apresentaram valores com significância estatística.

Tabela 3 – Análises multivariadas de uso e tempo de uso de colistina e meropenem, ter sido submetido a cirurgia e tempo de internação prévio a coleta de amostra em associação a aquisição do gene *mcr-1* por pacientes internados no HC-FMUSP de setembro de 2016 a janeiro de 2017

Variáveis	OR (IC 95%)[a]	*p*[a]	OR (IC 95%)[b]	*p*[b]	OR (IC 95%)[c]	*P*[c]	OR (IC 95%)[d]	*P*[d]
Uso de colistina	1,9 (0 - 6638)	0,87	2 (0,11 - 38)	0,63			1,2 (0,05 - 28)	0,9
Tempo de uso de colistina	0,4 (0 - 2,6)	0,35						
Uso de meropenem	4727 (0 - $1x10^9$)	0,18	18,9 (1,3 - 281)	0,03			20 (0,88 - 483)	0,05
Tempo de uso de meropenem	0,8 (0,5 - 1,4)	0,48						
Cirurgia	304 (0 - $3x10^6$)	0,22			13,6 (1,1 - 170)	0,04	8,9 (0,62 - 125)	0,1
Tempo de internação prévio a coleta	1,6 (0 - 3,9)	0,24			1,1 (0,98 - 1,2)	0,11		

Legenda: OR – *Odds ratio.* IC – Intervalo de confiança. a – Análise multivariada considerando todas as variáveis. b – Análise multivariada considerando uso de colistina e meropenem. c - Análise multivariada considerando cirurgia e tempo de internação prévio a coleta. d - Análise multivariada considerando uso de colistina e meropenem e cirurgia.

5.2 Isolados

A partir de 48 amostras coletadas foram isoladas 48 bactérias Gram-negativas. Destas, 30 (62,5%) isolados foram selecionados em meio com colistina e identificadas por MALDI-TOF, pertencentes a 11 espécies diferentes, (Tabela 4) dos quais 7 isolados foram positivos para o gene *mcr-1* por PCR. As informações em relação aos isolados de cada paciente estão descritas no Anexo 3.

Tabela 4 – Total de 30 isolados de bactérias Gram-negativas triados em meio com colistina e identificados por MALDI-TOF.

Espécie	Isolados
Enterobacter asburiae	1 (3,3%)
Escherichia coli	1 (3,3%)
Klebsiella aerogenes	1 (3,3%)
Klebsiella pneumoniae	9 (30%)
*Klebsiella quasipneumoniae**	1 (3,3%)
Morganella morganii	3 (10%)
Proteus mirabilis	9 (30%)
Proteus vulgaris	1(3,3%)
Providencia stuartii	1(3,3%)
Pseudomonas aeruginosa	1(3,3%)
Serratia marcescens	2 (6,7%)

Legenda: *Isolado identificado como *K. pneumoniae* por MALDI-TOF depois reclassificado como *K. quasipneumoniae* por sequenciamento total do genoma.

Os 7 isolados positivos para o gene *mcr-1* por PCR obtiveram resultados de CIM para colistina, meropenem e imipenem, PCR para plasmídeo tipo IncX4, PCR para *mcr-1* de DNA plasmidial e confirmação dos genes por sequenciamento Sanger dos amplicons apresentados no Quadro 5.

Quadro 5 – Resultados de CIM de antimicrobianos testados contra Enterobactérias resistentes a colistina isoladas de pacientes casos (colonizados e/ou infectados por Enterobactérias resistentes a colistina) e de pacientes contactantes (internados na mesma unidade e período de um caso), no HC-FMUSP de agosto de 2016 a janeiro de 2017, PCR para *mcr-1* e plasmídeo tipo IncX4 e sequenciamento Sanger

			MIC (mg/L) e Interpretação			**DNA Total**			**DNA Plasmidial**		
Isolados	**Pacientes**	**Espécie**	**COL**	**IMI**	**MPM**	**PCR para *mcr-1***	**Sequenciamento Sanger**	**PCR para plasmídeo IncX4**	**PCR para *mcr-1***	**Sequenciamento Sanger**	**PCR para plasmídeo IncX4**
CB'	Caso B	*K. pneumoniae*	32 R	16 R	>16 R	Positivo	*mcr-1* confirmado	Negativo	Negativo	N/A	N/A
CB1	Contactante de B	*P. stuartii*	>64 R	2 I	0,25 S	Positivo	Sem identificação	Negativo	Positivo	Sem identificação	Negativo
CB13	Contactante de B	*M. morganii*	>64 R	4 R	0,12 S	Positivo	Sem identificação	Negativo	Positivo	*mcr-1* confirmado	Negativo
CC	Caso C	*K. aerogenes*	16 R	1 S	< 0,03 S	Positivo	*mcr-1* confirmado	Negativo	Negativo	N/A	N/A
CC4	Contactante de C	*K. pneumoniae*	32 R	8 R	8 R	Positivo	*mcr-1* confirmado	Negativo	Negativo	N/A	N/A
CD	Caso D	*P. mirabilis*	>64 R	2 I	0,06 S	Positivo	*mcr-1* confirmado	Negativo	Negativo	N/A	N/A
CD3	Contactante de D	*K. quasipneumoniae*	16 R	0,12 S	< 0,03 S	Positivo	Sem identificação	Negativo	Positivo	Sem identificação	Negativo

Legenda: CIM – Concentração Inibitória Mínima; COL – Colistina; IMI – Imipenem; MPM – Meropenem. R – Resistente; I – Intermediário; S – Sensível; N/A – Não aplicável

No Quadro 6, estão descritos os resultados do Sequenciamento Total do Genoma de MLST, quando aplicável, concordância dos genes de resistência adquirida, bombas de efluxo e porinas, curados manualmente dos resultados gerados pelas ferramentas online, e tipos de plasmídeos. Foram apresentados apenas os fatores de virulência que apresentavam todos os genes relacionados a estes, em *Klebsiella spp.*

Os isolados CB' e CC4, de *K. pneumoniae*, além de resistentes a colistina por microdiluição, também foram resistentes ao imipenem e ao meropenem, ambos portadores do gene bla_{KPC-2}, que proporciona resistência aos carbapenêmicos, encontrado com frequência na espécie. Os dois pertencem ao ST-11, e carreiam genes de ESBLs como variantes de CTX-M, TEM e SHV. O isolado CD3, foi identificado como *K. pneumoniae* pela técnica de MALDI-TOF, porém na análise do sequenciamento total do genoma foi realizada reclassificação para *K. quasipneumoniae*.

O isolado CC de *K. aerogenes* era resistente apenas à colistina dentre os antimicrobianos testados, além de não possuir gene codificador de beta-lactamase, diferente dos outros isolados do gênero *Klebsiella* que possuíam, no mínimo, um gene *bla*.

O genoma completo dos isolados sequenciados foram depositados no DDBJ/EMBL/GenBank e podem ser consultados através dos números de acesso: QOIK00000000 (CB'), VHOL00000000 (CB1), VHOJ00000000 (CB13), VHOH00000000 (CC), VHOM00000000 (CC4), VHOK00000000 (CD), VICR00000000 (CD3).

Quadro 6 – MLST, genes de resistência adquirida, bombas de efluxo e porinas, tipos de plasmídeos e fatores de virulência de bactérias Gram-negativas resistentes a colistina isoladas de pacientes casos (colonizados e/ou infectados por Enterobactérias resistentes a colistina) e de pacientes contactantes (internados na mesma unidade e período de um caso), no HC-FMUSP de agosto de 2016 a janeiro de 2017 por Sequenciamento Total do Genoma

Isolados	Pacientes	Espécie	MLST	Genes de Resistência Adquirida	Genes de Bombas de Efluxo e Porinas	Plasmídeos	Fatores de Virulência
CB'	Caso B	*K. pneumoniae*	ST-11	*aac(3)-IIa, aac(6')-Ib3, $bla_{CTX-M-2}$, bla_{KPC-2}, bla_{OXA-2}, bla_{SHV-11}, bla_{TEM-1}, fosA, catI, sul1, dfrA*	*baeR, emrB, emrR, oqxA, oqxB, marA, marB, marR, tet(A), OmpK37*	ColRNAI, IncFIB(K), IncFIB(pQil), IncFII(K)	Fímbria tipo 3, AcrAB, Ent, RcsAB
CB1	Contactante de B	*P. stuartii*	N/A	*aac(2')-Ia, aac(3)-IIa, aac(6')-Ib-cr, aadA1, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, Sat2, $bla_{CTX-M-15}$, bla_{OXA-1}, qnrB1, erm(42), catIII, sul2, dfrA1, dfrA14*	*acrB, tet(A), tet(B), tet(R)*	IncA/C_2	N/A
CB13	Contactante de B	*M. morganii*	N/A	*bla_{MOR-2}*	Nenhum	Nenhum	N/A
CC	Caso C	*K. aerogenes*	N/A	*msbA*	*acrB, baeR, emrA, emrB, marA, marB, marR, oqxA, oqxB, soxS*	ColRNAI, IncL/M(pMU407)	Fímbria tipo I, AcrAB, Sal, Ybt
CC4	Contactante de C	*K. pneumoniae*	ST-11	*aac(3)-IIa, aac(6')-Ib-cr, aadA2, aph(3')-Ia, $bla_{CTX-M-15}$, bla_{KPC-2}, bla_{OXA-1}, bla_{SHV-11}, qnrS1, fosA, mph(A), msbA, sul1, dfrA12*	*acrA, acrD, acrR, baeR, emrA, emrB, marA, marB, marR, Mrx, oqxA, oqxB, tet(A), OmpK37*	IncFIB(K), IncFII(K), IncN	Fímbria tipo 3, AcrAB, Ent, Ybt, RcsAB
CD	Caso D	*P. mirabilis*	N/A	*cat*	*acrB, tet(J)*	Nenhum	N/A
CD3	Contactante de D	*K. quasipneumoniae*	ST-1308	*$bla_{OKP-B-6}$, fosA, msbA*	*acrB, acrD, acrR, baeR, emrB, marA, marB, marR, oqxA, oqxB, OmpK37*	IncFIB(K), IncFII(K), IncR	Fímbria tipo 3, AcrAb, Ent, RcsAb

Legenda: N/A – Não aplicável; Genes de resistência adquirida a: Aminoglicosídeo - *aac(2')-Ia, aac(3)-IIa, aac(6')-Ib3, aac(6')-Ib-cr, aadA1, aadph(3')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, Sat2;* Beta-lactâmico - *$bla_{CTX-M-2}$, $bla_{CTX-M-15}$, bla_{KPC-2}, bla_{MOR-2}, bla_{OXA-1}, bla_{OXA-2}, $bla_{OKP-B-6}$, bla_{SHV-11}, bla_{TEM-1}*; Fluoroquinolona – *qnrB1, qnrS1*; Fosfomicina – *fosA;* MLS (Macrolídeo, Lincosamida, Streptogramina B) – *erm(42), mph(A)*; Nitroimidazol – *msbA*; Fenicol – *cat, catI, catIII*; Sulfonamida – *sul1,* sul2; Trimetoprim – *dfrA, dfrA1, dfrA12, dfrA14*. Fatores de virulência para: Biofilme – Fímbria tipo 3, Fímbria tipo I; Bomba de efluxo – AcrAB; Aquisição de ferro – sideróforo Ent, Yersiniabactina Ybt, Salmochelina Sal; Regulação – RcsAB.

5.3 Alinhamento e similaridade de amplicons

Os amplicons dos isolados CB', CB13, CC, CC4 e CD estavam mais de 70% alinhados ao intervalo de nucleotídeos respectivo ao fragmento alvo (309pb) do gene *mcr-1*, cujos alinhamentos estão apresentados no Anexo 4. E as similaridades dos alinhamentos estão apresentadas na Tabela 5.

As sequências dos isolados CB1 e CD3 alinharam de forma fragmentada ao gene *mcr-1* (LIU *et al*., 2015) e menos de 70% estava dentro do fragmento alvo. E não houve cobertura de seus amplicons quando mapeados com fragmentos obtidos do sequenciamento total do genoma.

Os amplicons não se alinharam de forma contínua com outras sequências utilizadas. Os resultados da plataforma CARD, que indicavam alguma variante de *mcr* apenas quando utilizada a opção "*Loose Hits*", foram analisados e indicavam outras PEtN não *mcr*, e os amplicons não se alinhavam com estes.

Foram avaliados e comparados com as fosfoetanolaminas das espécies *M. catarrhalis* (ICR^{Mc}) e *M. osloensis* (ICR^{Mo}), das quais apenas a sequência do isolado CB' alinhou-se de forma contínua com outro gene além do *mcr-1*, como indicado no Anexo 4.

As sequências dos primers de *mcr-1* utilizados foram comparadas com o sequenciamento de genoma total das amostras, porém não foi encontrado mapeamento com os fragmentos sequenciados.

Tabela 5 – Similaridades equivalentes de alinhamento de amplicons de isolados positivos para *mcr-1* de pacientes casos e contactantes com fragmento alvo de PCR para *mcr-1* e gene ICR^{Mo}

Isolados	Espécie	Unidade do caso	Data do caso	Pacientes	Gene	Similaridade Equivalente
CB'	*K. pneumoniae*	UP4C	12/09/2016	Caso B	*mcr-1*	99,0%
					ICR^{Mo}	66,7%
CB13p	*M. morganii*			Contactante de B	*mcr-1*	91,3%
CC	*K. aerogenes*	UP4C	17/12/2016	Caso C	*mcr-1*	92,2%
CC4	*K. pneumoniae*			Contactante de C	*mcr-1*	73,5%
CD	*P. mirabilis*	UPSCI	02/01/2017	Caso D	*mcr-1*	95,7%

Legenda: p – Extração plasmidial.

Foi realizada também análise de similaridade entre os amplicons identificados como *mcr-1* pela ferramenta Blast®, cujas porcentagens estão apresentadas na Tabela 6, o alinhamento das mesmas no Anexo 4.

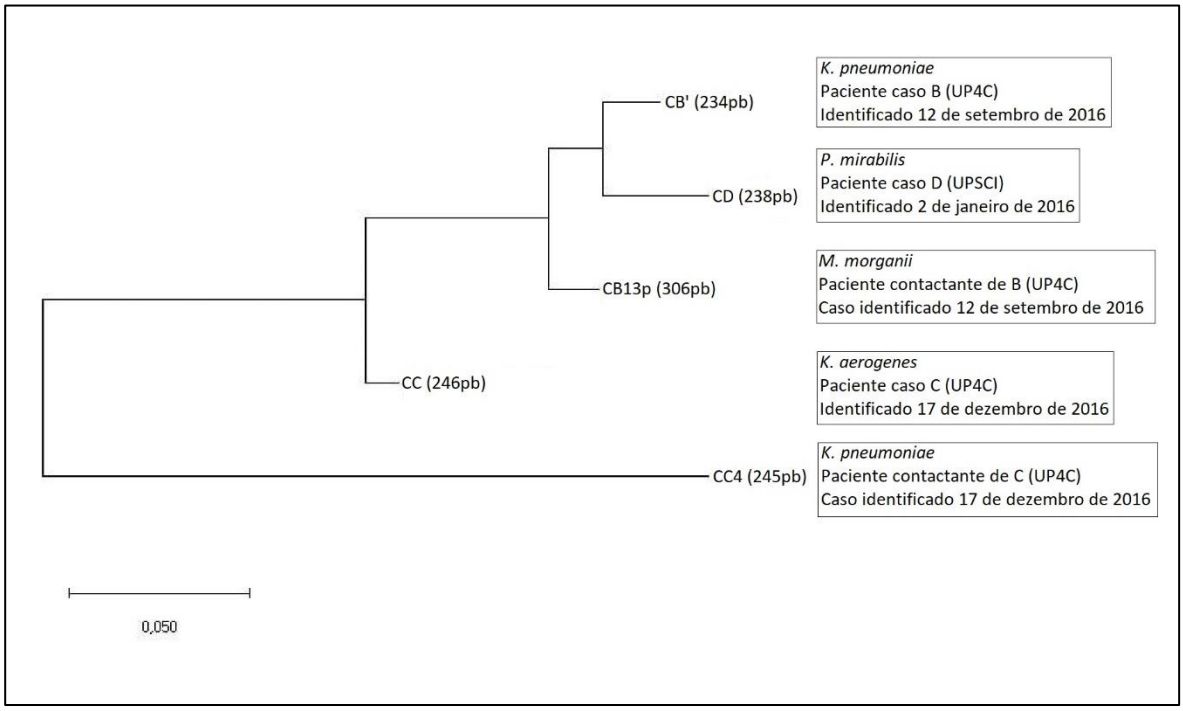
Tabela 6 – Similaridades equivalentes entre amplicons de PCR para *mcr-1* de cinco isolados positivos para o gene confirmados por sequenciamento Sanger de pacientes casos e contactantes

Amplicons				**CB'**	**CB13p**	**CC**	**CC4**	**CD**
	Unidade e Data de Caso			UP4C 12/09/2016		UP4C 17/12/2016		UPSCI 02/01/2017
		Pacientes		Caso B	Contactante de B	Caso C	Contactante de C	Caso D
		Espécies		*K. pneumoniae*	*M. morganii*	*K. aerogenes*	*K. pneumoniae*	*P. mirabilis*
CB'	UP4C 12/09/2016	Caso B	*K. pneumoniae*	ID	94,2%	90,6%	69,9%	93,3%
CB13p	UP4C 12/09/2016	Contactante de B	*M. morganii*	94,2%	ID	91,7%	72,9%	93,7%
CC	UP4C 17/12/2016	Caso C	*K. aerogenes*	90,6%	91,7%	ID	74,0%	92,0%
CC4	UP4C 17/12/2016	Contactante de C	*K. pneumoniae*	69,9%	72,9%	74,0%	ID	71,8%
CD	UPSCI 02/01/2017	Caso D	*P. mirabilis*	93,3%	93,7%	92,0%	71,8%	ID

Legenda: UP4C – UTI de Traumatologia. UPSCI – Unidade de Cuidados Intermediários do Pronto Socorro. p – extração plasmidial. ID – mesmo amplicon.

O fragmento do isolado CB', referente ao caso B, era teve maior relação com o isolado CD, referente ao caso D, internados em diferentes períodos, logo não tiveram contato em nenhum momento. O terceiro fragmento mais similar aos dois anteriores foi do isolado de um paciente contactante de B, depois do isolado de C, e mais distante foi o fragmento do isolado de um paciente

contactante de C (Figura 7). A ordem não seguiu a linha cronológica de identificação dos pacientes nem foi observada relação pareada dos isolados de caso e contactante.



Legenda: a escala representa o número de substituições de nucleotídeos por base. Nome do isolado (tamanho do fragmento); UP4C – UTI da Traumatologia; UPSCI – Unidade de Cuidados Intermediários do Pronto Socorro.

Figura 7 – Árvore filogenética de amplicons de cinco isolados positivos para *mcr*-1 confirmados por sequenciamento Sanger de pacientes casos e contactantes

5.4 Conjugação

Prévio aos testes de conjugação, as cepas doadoras foram testadas em ágar MacConkey contendo o antimicrobiano utilizado para seleção da respectiva cepa receptora. Os isolados CB', CC, CC4 e CD3, semeados em meio com estreptomicina a 2 mg/mL não cresceram, e os isolados CB1, CB13 e CD, semeados em meio com azida sódica a 0,3 mg/L, também não.

Os testes de conjugação foram realizados no máximo três vezes para cada par doadora/receptora, indicados na Tabela 7. Nas placas contendo 2 antimicrobianos, houve crescimento de menos de cinco colônias por tentativa, independentemente do tempo de incubação. Foi testado inoculação de 100µL com 48 horas de incubação do par e do sedimento após centrifugação, ambas sem crescimento.

Tabela 7 – Teste de conjugação de plasmídeos carreadores de *mcr-1* de Enterobactérias isoladas de pacientes casos e contactantes, CIM de colistina e PCR para *mcr-1* de isolados transconjugantes

Espécie	Cepa doadora	Cepa receptora	Crescimento de Transconjugante	CIM colistina (2 mg/L) e Interpretação	PCR para *mcr*-1
K. pneumoniae	CB'	C600	2ª e 3ª tentativas	0,5 Sensível	Negativo
P. stuartii	CB1	J53	Sem crescimento	N/A	N/A
M. morganii	CB13	J53	Sem crescimento	N/A	N/A
K. aerogenes	CC	C600	2ª e 3ª tentativas	0,5 Sensível	Negativo
K. pneumoniae	CC4	C600	2ª e 3ª tentativas	0,5 Sensível	Negativo
P. mirabilis	CD	J53	2ª e 3ª tentativas	0,5 Sensível	Negativo
K. quasipneumoniae	CD3	C600	Sem crescimento	N/A	N/A

Legenda: C600 – *E. coli*; J53 – *E. coli;* N/A – Não aplicável.

As cepas transconjugantes foram repicadas em ágar MacConkey contendo colistina a 2 mg/L prévio a todos os experimentos a que foram submetidos e apresentaram coloração referente à cepa receptora utilizada.

A determinação da CIM para colistina dos transconjugantes foi realizada em duplicata e comparado com CIM para colistina da respectiva cepa receptora. Nenhuma cepa transconjugante se tornou resistente a colistina, porém quando comparadas às CIM das receptoras, os transconjugantes provenientes de CB', CC e CC4 aumentaram em uma concentração (CIM de $C600^{STR}$=0,25 mg/L). Ao passo que o transconjugante de CD diminuiu uma concentração (CIM de $J53^{AZD}$=1 mg/L).

A PCR para *mcr-1*, foi realizada com DNA total, extraído por fervura e por kit, e com DNA plasmidial, porém todos foram negativos.

5.5 Análise de genes cromossomais de resistência a colistina

Na curadoria manual dos genes cromossomais de resistência a colistina a maior parte dos genes foi encontrada conservada. O gene *mgrB* estava ausente ou mutado nos isolados de *Klebsiella spp.* O gene *phoQ* estava

conservado em todos os isolados. O Quadro 7 apresenta os genes estudados e suas mutações

Quadro 7 – Análise de genes cromossomais de resistência a colistina de cinco isolados Enterobactérias positivas para *mcr-1* identificadas no HC-FMUSP, no período de agosto de 2016 a janeiro de 2017

Isolado	Espécie	ST	Conservados	Mutados	Ausentes
CB'	*K. pneumoniae*	ST-11	*phoP, phoQ, pmrA, pmrB, eptA, eptB, arnB, arnC, arnA, arnT, crrB*	*mgrB* - ΔM1, ΔK2, R5X, substituição de 20 aa iniciais restantes	-
CB1	*P. stuartii*	N/A	*phoP, phoQ, cptA, arnA, arnT*	*mgrB* - M1L *arnB* - T82I *arnC* - M1V	-
CB13	*M. morganii*	N/A	*mgrB, phoQ, eptA, eptB, arnA*	*phoP* - T17A *arnB* - D113A, T116A, R164G *arnC* - M1V *arnT* - A94V	-
CC	*K. aerogenes*	N/A	*phoP, phoQ, pmrA, eptA, arnC*	*pmrB* - M87V, L128M, T157P *eptB* - A128S, A129V, H363R, V554M *arnB* - A308V *arnA* - I356V, W367L, K377R *arnT* - D21G, R138H, A268S, T3000S	*mgrB*
CC4	*K. pneumoniae*	ST-11	*phoP, phoQ, pmrA, pmrB, eptA eptB, arnB, arnC, arnA, arnT, crrB*	*mgrB* - substituição de 20 aa iniciais	-
CD	*P. mirabilis*	N/A	*mgrB, phoP, phoQ, arnB, arnA, arnT*	*arnC* - M1V *eptC* - N539D	-
CD3	*K. quasipneumoniae*	ST-1308	*phoP, phoQ, pmrA, eptB, arnC, arnA, arnT*	*mgrB* - M1X, substituição aa 2-15 *pmrB* - E60Q, M86V, M175V *eptA* - L426V *arnB* - E145G	*crrB*

Legenda: N/A – Não aplicável. Δ – deleção; X – *stop* codon; aa – aminoácidos.

5.6 Análise de ação e genes de bombas de efluxo para colistina

A determinação da CIM de colistina na presença do inibidor de bombas de efluxo, CCCP, apresentou resultados positivos para ação delas em

todos os isolados. A menor diminuição de CIM ocorreu com a cepa de *P. stuartii* e a maior com a cepa de *M. morganii*, como demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 – Teste de ação de bombas de efluxo com CCCP de cinco isolados de Enterobactérias resistentes a colistina positivas para *mcr-1*, identificadas no HC-FMUSP no período de agosto de 2016 a janeiro de 2017

Isolado	Espécie	CIM de COL (mg/L)	CIM de COL + CCCP (mg/L)	Variação de CIM	Inibição de Bomba por CCCP
CB'	*K. pneumoniae*	32	0,5	64	Positivo
CB1	*P. stuartii*	>64	8	>8	Positivo
CB13	*M. morganii*	>64	0,25	>256	Positivo
CC	*K. aerogenes*	32	0,25	128	Positivo
CC4	*K. pneumoniae*	32	1	32	Positivo
CD	*P. mirabilis*	>64	2	>32	Positivo
CD3	*K. quasipneumoniae*	32	1	32	Positivo

Legenda: CIM – ConcentraçãoInibitória Mínima. Variação de CIM foi calculada dividindo-se CIM de colistina por CIM de colistina em presença de CCCP. O valor representa diminuição exponencial de CIM.

A análise dos genes de bombas de efluxo demonstrou que a maioria estava conservada, com exceção dos genes *acrR,* que apresentou a mutação T12I, e *acrB,* com a mutação T329A, no isolado CB1 da espécie *P. stuartii*. E no gene *acrB* a mutação N1039D no isolado CB13 da espécie *M. morganii.*

6. Discussão

Até o momento, este é o primeiro estudo brasileiro que avalia fatores de risco para transmissão de isolados de Enterobactérias resistentes à colistina carreadoras de *mcr*-1 e da própria transmissão do gene plasmidial *mcr*-1 em um hospital de alta complexidade. A maior parte dos estudos descreve características laboratoriais dos isolados carreadores de *mcr-1*, e quando identificado em amostras de infecção ou colonização em seres humanos discorrem sobre históricos clínicos dos envolvidos sem avaliar fatores de risco (FERNANDES *et al.,* 2016a; ROCHA *et al.,* 2017; AIRES, *et al.,* 2017; CONCEIÇÃO-NETO *et al.,* 2017; DALMOLIN *et al.,* 2017a; ROSSI *et al.,* 2017; DALMOLIN *et al.,* 2017b; LORENZONI *et al.,* 2018; HIGASHINO *et al.,* 2018; NETO *et al.,* 2019)

Na casuística do presente estudo, a identificação do gene *mcr*-1 ocorreu em três dos quatro casos estudados, em duas unidades diferentes, UP4C (UTI da Traumatiologia) e UPSCI (Unidade de Cuidados Intermediários do Pronto Socorro). O gene *mcr*-1 foi identificado em diferentes gêneros e espécies de Enterobactérias. Entretanto, não foi possível transferir o plasmidio carreador do gene *mcr*-1 por meio de conjugação.

O uso de meropenem durante internação e prévio a coleta e a duração do seu uso foram fatores de risco para aquisição do gene *mcr-1 na* análise univariada. Entretanto, apenas duração do uso de meropenem permaneceu como fator de risco nos diferentes modelos de análise multivariada. Similar aos achados de Wang e colaboradores (2017), que indicaram o uso de carbapenêmicos como fator de risco para infecção por *E. coli* carreador de *mcr-1*. No entanto, em estudo de colonização por isolado de *E. coli* positivo para o gene, os fatores de risco apontados foram diferentes, como o uso de antibióticos prévio à internação, mas enquanto hospitalizado o uso não foi relevante, além de outras características sociais e geográficas (WANG *et al.,* 2017). Dentre os 10 estudos brasileiros de *mcr-1* em pacientes hospitalizados, o uso de

meropenem prévio a identificação do gene se destaca em 4 (FERNANDES *et al.,* 2016a; CONCEIÇÃO-NETO *et al.,* 2017; ROSSI *et al.,* 2017; HIGASHINO *et al.,* 2018). Sete destes relatos de caso não têm descrição de uso de antimicrobianos pelos pacientes, sendo 3 em formato de carta (ROCHA *et al.,* 2017; CONCEIÇÃO-NETO *et al.,* 2017; LORENZONI *et al.,* 2018).

O uso de colistina apresentou valores com tendência ser a significância. A duração do uso colistina foi fator de risco para aquisição de *mcr-1* na análise univariada, mas não permaneceu significativo na análise multivariada. Os achados desse estudo são similares aos relatos brasileiros que identificaram o gene *mcr-1* em amostras humana. Dentre os casos descritos sua utilização não foi observada com frequência, com excessão do estudo de Higashino e colaboradores (2018) conduzido no HC-FMUSP, cujos pacientes receberiam combinação de colistina e meropenem de forma empírica. Além deste, outro estudo relatou uso de polimixina B prévio a identificação de um isolado de colonização carreador de *mcr-1* (AIRES, *et al.,* 2017). Mesmo na China, o país com maior número de estudos de *mcr-1*, Tian e colaboradores (2017) evidenciaram que colistina não foi utilizada durante internação pelos 6 pacientes durante surto hospitalar. Outro surto hospitalar, em Portugal, que envolveu 16 pacientes, não decreve uso de colistina prévio a identificação de *mcr-1*. Assim, a colistina pode não ser fator determinante para aquisição de *mcr-1*.

Ser submetido a cirurgia e tempo de internação prévia a coleta de amostras foram fatores de risco para aquisição de *mcr-1* na análise univariada. Porém, podem estar relacionados a condições mais debilitadas dos pacientes pelos procedimentos realizados e consequente hospitalização estendida. Além de aumentar a exposição ao ambiente hospitalar, reservatório de bactérias Gram-negativas multirresistentes. Entretanto, não permanceram no modelo na análise multivariada.

Outros achados interessantes do presente estudo foram a identificação do gene *mcr*-1 em Enterobactérias intrinsecamente resistentes a colistina, como *P. mirabilis* e *M. morganii.* Além de alguns isolados de

Enterobactérias que apresentavam outros mecanismos de resistência a colistina, incluindo mutação cromossômica e bomba de efluxo.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em conjunto com as Secretarias de Saúde Estaduais recomenda a notificação de casos de infecção e colonização por *E. coli* resistentes a colistina por meio do Comunicado de Risco nº 01/2016 (GVIMS/GGTES/ANVISA). No qual também está destacado que isolados portadores do gene, encontrados no Brasil até então, apresentavam baixos níveis de resistência ao antimicrobiano e sensibilidade a carbapenêmicos. Apesar dessa recomendação o relato de *mcr*-1 em hospitais brasileiros é infrequente. Essa provável subnotificação pode ser decorrente da dificuldade para identificação desse mecanismo de resistência.

O gene *mcr-1* pode estar presente em isolados resistentes a carbapenêmicos, por exemplo por produção de carbapenemases. Zhang e colaboradores (2018) e Mendes e colaboradores (2018) já relataram coprodução de KPC-2 e KPC-3, respectivamente, em isolados de *K. pneumoniae* carreadores de *mcr-1*. Do mesmo modo, no Brasil há relatos de *E. coli* e *K. pneumoniae* portadoras de *mcr-1* coprodutoras de KPC-2 (AIRES *et al.,* 2017; CONCEIÇÃO-NETO *et al.,* 2017; DALMOLIN *et al.,* 2017a; DALMOLIN *et al.*, 2017b; HIGASHINO *et al.,* 2018). Como ocorreu com 2 (CB' e CC4) dos 7 isolados encontrados neste estudo, cujos fenótipos foram resistentes a meropenem e a imipenem por microdiluição em caldo. Dessa maneira, a investigação de *mcr-1* não deve ser limitada a Enterobactérias sensíveis a carbapenêmicos, mas de modo geral a qualquer isolado resistente a colistina.

A triagem de casos de colonização por Enterobactéria resistente a colistina de pacientes contactantes não costuma ser realizada nos hospitais Brasileiros. No entanto, pode ser uma abordagem para controle de disseminação, uma vez que a transmissão de *mcr-1* entre diferentes espécies e o gene já foram descritos no HC-FMUSP em estudos anteriores (ROSSI *et al.,* 2017; HIGASHINO *et al.,* 2018; NETO *et al.,* 2019).

Desde a descrição do gene *mcr-1*, houve desenvolvimento de meios para detecção de Enterobactérias resistentes a polimixinas, como os

Superpolymyxin™ desenvolvido por Nordmann e colaboradores (2016) e Rapid Polymyxin™ NP por Poirel e colaboradores (2018). Ambos visam detecção de isolados resistentes a polimixinas por meio de meios seletivos contendo colistina, e diferenciais por coloração de colônias no primeiro, e mudança de cor do meio no segundo. Porém, não há diferenciação entre resistência adquirida ou intrínseca. E nenhum destes métodos está disponível no Brasil, levando a triagem com meios caseiros e confirmação por testes moleculares, considerados padrão ouro como realzido no presente estudo.

Conforme descrito anteriormente, *mcr-1* e uma variante, *mcr-3.10*, já foram identificados em isolados de espécies intrinsecamente resistentes a colistina. Dois isolados, um de *P. mirabilis* e outro de *P. stuartii*, obtidos de um pato doméstico e de lavado de moscas, respectivamente, alertaram para possível mecanismo de disseminação silencioso, uma vez que estas espécies não são investigadas para o gene *mcr-1* (WANG *et al.,* 2018a; ZHANG *et al.,* 2017b). Deste modo, os dados do presente estudo suportam a possibilidade do gene *mcr-1* ser plasmidial e não cromossomoal nos isolados CB1 (*P. stuartii*), CB13 (*M. morganii*) e CD (*P. mirabilis*), como identificado por Wang e colaboradores (2018). Embora a transmissão não tenha ocorrido por conjugação, o indício de que o gene *mcr-1* é plasmidial nestas espécies é reforçado por não ter sido encontrado no sequenciamento total do genoma

A presença de genes de ESBLs, como variantes de CTX-M, TEM, SHV, foi observada em dois isolados de *K. pneumoniae* dos três avaliados, seguindo a mesma tendência de *E. coli* descrita por Wu e colaboradores (2018). E da frequência alta de ESBLs do tipo CTX-M em isolados carreadores de *mcr-1* reportada por Fernandes e colaboradores (2016b), no Brasil.

A não detecção do gene por sequenciamento total do genoma no presente estudo pode ter ocorrido por instabilidade do plasmídeo carreador do gene, uma vez que não foram encontrados indícios de plasmídeos IncX4, comumente descritos. Os tipos de plasmídeos identificados não têm descrição de serem carreadores de *mcr-1*, com exceção de IncA/C_2 (KIEFFER *et al.,* 2018), do isolado CB1. No entanto, não foi possível determinar se havia relação com *mcr-1*.

O alinhamento dos amplicons obtidos não apresentou resultados uniformes para afirmar que seriam clones do mesmo gene. Pela árvore filogenética, pode ser observado que os contactantes e respectivos casos não foram mais semelhantes entre si do que com as outras sequências.

Na espécie *K. pneumoniae* o gene já foi descrito em diversos STs, incluindo o ST-11, como dois isolados (CB' e CC4) deste estudo. Zhang e colaboradores (2018) relataram um isolado, que apresentava além de *mcr-1* resistência a colistina por mutação cromossômica, especificamente, inativação do gene *mgrB*. O isolado de *K. quasipneumoniae* ST-1308 (anteriormente *K. pneumoniae* ST-1308) não possui descrição de carreamento de *mcr-1*, além de ser a primeira descrição do ST no Brasil.

No presente estudo, outros mecanismos de resistência a colistina foram encontrados nos isolados de Enterobactérias resistentes a colistina. Dentre os isolados de *Klebsiella spp.,* o gene com maior variação foi o *mgrB*, descrito como principal regulador da resistência a colistina em *K. pneumoniae* por Baron e colaboradores (2016). Como observado em estudos anteriores (HADJADJ *et al.,* 2017; ZHANG *et al.,* 2018), um *stop codon* prematuro, como em CB' (R5X) e CD3 (M1X), e/ou deleção de parte do gene, como em CB' novamente (ΔM1, ΔK2), pode causar inativação do *mgrB* gerando um *upregulation* de *phoPQ*. No isolado CC4 (*K. pneumoniae*), a CIM de 32 mg/L para colistina provavelmente é resultante da inativação do *mgrB,* por ser o único gene mutado com uma substituição dos 20 amino ácidos iniciais, do que influência de *mcr-1*. Apesar disso, por possuir outros genes de resistência adquirida, incluindo codificadores de beta-lactamases ativos de acordo o fenótipo, o isolado representa um risco potencial a infecção por Enterobactéria multirresistente.

Já no isolado CC, de *K. aerogenes,* supôs-se que a ausência do *mgrB* tenha gerado o fenótipo resistente a colistina, como já descrito em *K. pneumoniae*, como sugerido por Bedenić e colaboradores (2017).

O mecanismo de bombas de efluxo para colistina foi confirmado em todos os isolados. Apenas CB1 (*P. stuartii*), continuou resistente e apresentou

menor variação de CIM na presença de CCCP quando comparado com os isolados CB13 (*M. morganii*) e CD (*P. mirabilis*) de espécies também intrinsecamente resistentes a colistina. Diferindo em parte dos achados do estudo de Baron e Rolain (2018), no qual todos os isolados também se tornaram sensíveis, porém a variação média de CIM de colistina foi 614 vezes menor. Nesse estudo a média de diminuição de CIM dos isolados intrinsecamente resistentes foi aproximadamente de 99 vezes. Já os quatro isolados de *Klebsiella spp*., apresentaram diminuição média em 64 vezes da CIM com CCCP em relação a colistina pura, igualdando-se a diminuição de isolados portadores de *mcr-1* e menor do que a de isolados resistentes por mutações cromossômicas (BARON e ROLAIN, 2018).

Na análise dos genes de bomba de efluxo codificadores do sistema *acrRAB-TolC*, uma mutação apenas em CB1 (*P. stuartii*) nos genes *acrR* e *acrB* pode ser responsável pela divergência do fenótipo encontrado. Devido às mutações, as bombas de efluxo podem não ser tão responsáveis pela resistência a colistina netes isolado. Portanto, o fenótipo seria um reflexo maior da atividade do operon *arnBCADTEF*. Outra possibilidade é o sistema se comportar de forma similar a *mgrB* e *phoPQ*. Levando em conta que o gene *acrR* é um regulador de *acrAB*, a mutação pode ter levado a diminuição de sua atividade, resultando no *upregulation* de *acrAB* compensando com um efluxo acima do normal mesmo com baixa produção de ATP. Mais estudos são necessários para determinar as bases moleculares destes achados.

Já o isolado CB13 (*M. morganii*), se comportou de forma similar com os estudados por Baron e Rolain (2018), indicando que a mutação N1039D em *acrB* não seria relevante para o fenótipo.

As limitações do estudo foram o número de pacientes relativamente pequeno. A identificação e coleta de pacientes contactantes com diferentes intervalos desde a notificação do caso. A plataforma de sequenciamento disponível não era a mais indicada para detecção de plasmídeos, estruturas que por si só aumentam a dificuldade de estudo. E não foi possível analisar os isolados de infecção dos casos para avaliar se esta foi causada pelos isolados de colonização encontrados e a falta de dados de colonização dos pacientes no

momento da internação para verificar provável aquisição de *mcr-1* na comunidade ou durante internação.

7. Conclusões

A transmissão do gene *mcr*-1 ocorreu entre diferentes gêneros e espécies de Enterobactérias, incluindo espécies intrinsecamente resistentes a colistina. Entretanto, não se obteve sucesso na transferência do gene *mcr-1* por meio da conjugação.

O gene *mcr-1* foi identificado em isolados resistentes aos carbapenêmicos, incluindo Enterobactérias carreadoras de carbapenemases da classe serina. Este achando alerta para o fato de que a triagem do gene *mcr-1* deve ser realizada em todas as Enterobactérias resistentes a colistina.

O uso de meropenem e colistina, ser submetido a cirurgia e tempo de internação foram fatores de risco na análise univariada para aquisição do gene *mcr-1* em pacientes hospitalizados. Entretanto, apenas tempo de uso de meropenem foi fator de risco independente na análise multivariada.

Os isolados positivos para *mcr-1* por PCR não foram confirmados no sequenciamento total do genoma, mas há indícios de possível carreamento do gene em *K. pneumoniae, K. aerogenes, P. mirabilis* e *M. morganii*, via plasmídeos instáveis ou não conjugativos, e não por plasmídeos tipo IncX4.

Outros mecanismos de resistência à colistina, incluindo mutação cromossômica e bomba de efluxo, foram observados em isolados carreadores de *mcr*-1, evidenciando a complexidade da resistência a colistina nas Enterobactérias.

O uso de inibidor de bomba de efluxo (CCCP) teve resultados positivos *in vitro* em isolados resistentes a colistina por mutações cromossômicas e intrínsecos resistentes.

Este foi o primeiro estudo a descrever *K. quasipneumoniae* (anteriormente classificada como *K. pneumoniae*) pertencente ao ST-1308 no Brasil e carreadora de *mcr-1.*

8. Anexos

8.1 Anexo 1: Parecer de aprovação da Comissão de Ética na Plataforma Brasil

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do tempo de colonização por bactérias Gram negativas resistentes a colistina e/ou carbapenêmicos, positivas para os genes NDM-1 e MCR-1 em pacientes do Hospital das Clinicas, Faculdade de Medicina de São Paulo (HC-FMUSP).

Pesquisador: silvia figueiredo costa
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 79975917.8.0000.0068
Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.452.282

Apresentação do Projeto:
Projeto novo denominado Avaliação do tempo de colonização por NDM-1 e MCR-1 em pacientes do Hospital das Clinicas, Faculdade de Medicina de São Paulo (HC-FMUSP). Que será realizado em pacientes internados no HC-FMUSP

Objetivo da Pesquisa:
Verificar o tempo de colonização por bactérias positivas para NDM e MCR em pacientes que estiveram internados no HC-FMUSP e após alta do hospital. Estes genes são derivados de plamídeos, que conferem resistência a vários antimicrobianos inclusive colistina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Estudo de importância científica, pois a detecção destes genes, associados a Testes de sensibilidade pode proporcionar o conhecimento do que ocorre atualmente dentro do Hospital das Clínicas. A detecção destes genes pode futuramente proporcionar medidas de tratamento e profilaticas inclusive após a alta dos pacientes e mesmo seus familiares.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Trata-se de um estudo descritivo prospectivo, onde serão avaliados todos pacientes que apresentarem infecção ou colonização por bactérias positivas para NDM e ou MCR-1 durante a internação hospitalar, que serão acompanhados após alta até a descolonização. Sem dúvida é um

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo 1: Parecer de aprovação da Comissão de Ética na Plataforma Brasil **(Continuação)**

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Plataforma Brasil

Continuação do Parecer: 2.452.282

Estudo de importância para os pacientes e para se adquirir novos conhecimentos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Proposta bem elaborada. Com Bibliografia adquada e também justificativa adequada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugiro aprovação sem necessidade de modificações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c)apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_938878.pdf	14/11/2017 15:24:34		Aceito
Outros	Cadastro_online.pdf	14/11/2017 15:24:14	silvia figueiredo costa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ParecerNDM.pdf	06/10/2017 16:00:01	silvia figueiredo costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmcr.pdf	06/10/2017 15:59:42	silvia figueiredo costa	Aceito
Folha de Rosto	Folharostro.pdf	06/10/2017 15:59:27	silvia figueiredo costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	MCR1.docx	27/06/2017 15:32:29	silvia figueiredo costa	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo 1: Parecer de aprovação da Comissão de Ética na Plataforma Brasil **(Conclusão)**

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.452.282

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 21 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Joel Faintuch
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

8.2 Anexo 2: Perfil da população estudada com relação a gênero, idade, doenças de base, tempo de hospitalização, tempo de contato e desfecho

Paciente	Gênero	Idade	Doenças de base	Tempo de hospitalização (dias)	Tempo de contato (dias)	Desfecho	Uso de Antimicrobiano em internação
S1	F	41	Fratura da Coluna, drogas, álcool	54	13	Alta	Cefuroxina
S2	M	64	Neoplasia maligna pâncreas, tabaco	28	5	Alta	Ceftriaxone, Metronidazol
S3	M	76	Traumatismo intracraniano, DM, IAM	23	15	Alta	Cefuroxima
S4	F	87	Traumatismo intracraniano, hipotireoidismo; história de colectomia por retocolite ulcerativa	11	9	Alta	Cefuroxima
S6	M	59	Neoplasia maligna do cólon ascendente, tabaco, DM, ansiedade generalizada	11	7	Alta	Metronidazol + Ciprofloxacina
S7	F	56	Doença pulmonar obstrutiva crônica com exacerbação aguda não especificada	34	14	Alta	Ceftriaxona + Claritromicina, Levofloxacina
S8	M	52	Afecções de artérias e arteríolas, não especificadas	48	36	Alta	Ciprofloxacina, Fluconazol
S9	M	69	DM com complicações circulatórias periféricas	32	30	Alta	Ceftriaxona, Ampicilina
S11	M	61	Traumatismo intracraniano	61	28	Transferência	Piperacilina + Tazobactam, Vancomicina
S12	M	93	Hemorragia sub-dural (aguda) (não-traumática), IRA, neoplasia maligna da próstata	14	5	Óbito	Nenhum
S13	M	48	Pneumonia não especificada, traumatismo cerebral focal, álcool, transtorno comportamental	15	14	Alta	Piperacilina + Tazobactam
S14	M	49	Varizes esofagiantes sangrantes, fibrose e cirrose hepáticas, hepatite viral crônica C, AIDS	28	27	Óbito	Ciprofloxacina, Ceftrixona, Ampicilina, Amicacina, Meropenem
S15	M	55	Pneumonia não especificada, pneumocistose, angina pectoris, insuficiência renal crônica, IRA dialítica, transplante renal há 5 anos, valvopatia	41	28	Alta	Nenhum
S16	M	62	Pancreatite aguda, doença de Chagas, IC, AVC	5	5	Alta	Nenhum
S17	M	73	Doenças pulmonares obstrutivas crônicas, IC, doença renal em estágio final	73	52	Alta	Cefepima, Vancomicina
S18	F	83	Infarto miocárdio, HAS, DM, tabaco, amputação falange distal	20	10	Alta	Ciprofloxacina, Clindamicina, Piperacilina + Tazobactam, Vancomicina

Continua

Anexo 2: Perfil da população estudada com relação a gênero, idade, doenças de base, tempo de hospitalização, tempo de contato e desfecho **(Continuação)**

S19	M	73	Fratura dos ossos malares e maxilares, HAS, hiperplasia benigna da próstata	23	18	Alta	Ceftriaxona, Clindamicina
S20	M	56	IRA, conjuntivite, pancreatite aguda	12	8	Alta	Ciprofloxacina
S21	F	51	Epilepsia, paralisia infantil, HAS, Cirrose	67	41	Alta	Claritromicina + Ceftriaxona, Colistina, Piperalicina + Tazobactam, Vancomicina, Metronidazol
S22	M	52	Icterícia não especificada, neoplasia maligna do pâncreas, neoplasia malignada orofaringe	13	13	Alta	Piperacilina + Tazobactam
S23	M	57	Doença renal em estágio final	143	31	Alta	Ciprofloxacina
S24	M	75	IC, diálise renal, insuficiência renal crônica, sequelas de AVC não especificado como hemorrágico ou isquêmico, colelitíase crônica; HAS; AVCi	71	56	Alta	Claritromicina, Piperacilina + Tazobactam, Ceftriaxona
S25	F	86	Embolia e trombose arteriais, IRA, DM, "Flutter" e fibrilação atrial, outra embolia e trombose venosas, IC não especificada, outro delirium, doença arterial oclusiva periférica; HAS; obesidade; AVCi	21	14	Óbito	Piperacilina + Tazobactam
S26	M	57	Cirrose hepática alcoólica, pneumonia bacteriana não classificada, constipação, encefalopatia não especificada	25	25	Alta	Ceftriaxona + Claritromicina, Aciclovir + Ampicilina, Vancomicina, Meropenem
S27	F	20	Neoplasia de comportamento incerto ou desconhecido do encéfalo e do SNC, previamente hígido	9	9	Alta	Nenhum
S31	M	58	Septicemia não especificada, cirrose hepática, neoplasia do SNC secundária, craniotomia, trombose cefálica, síndrome mielodisplásica	151	124	Óbito	Cefuroxina, Vancomicina, Colistina, Ciprofloxacina, Meropenem
ST1	M	34	Traumatismo craniano encefálico grave, craniotomia, PICC com ISC, morte encefálica	17	14	Óbito	Vancomicina, Meropenem, Colistina
ST2	F	41	Calculose de via biliar com colangite, trombose de veia porta, abscesso hepático	28	5	Alta	Ciprofloxacina, Meropenem, Vancomicina
ST3	F	48	Fraturas múltiplas da coluna cervical	10	5	Alta	Nenhum

Continua

Anexo 2: Perfil da população estudada com relação a gênero, idade, doenças de base, tempo de hospitalização, tempo de contato e desfecho **(Continuação)**

ST4	M	62	Traumatismo intracraniano, septicemia não especificada, choque não especificado, DM	20	4	Óbito	Nenhum
ST6	M	33	Pancreatite aguda	115	47	Alta	Ciprofloxacina, Imipenem/ Cilastatina, Colistina, Vancomicina, Fluconazol
ST7	M	36	DVE frontal direita, desbridamento de craniotomia, ampliação descompressiva, queda de 6 m	42	4	Óbito	Colistina, Vancomicina
ST8	M	30	Concussão cerebral, edema cerebral traumático	9	5	Alta	Nenhum
ST9	F	78	Insuficiência respiratória aguda, queda no mesmo nível - local não especificado, doenças infecciosas, AS não especificadas, choque cardiogênico, IRA do pós-parto	45	44	Óbito	Cefuroxina, Ciprofloxacina, Colistina, Vancomicina
ST10	F	72	ICS por S. aureus, insuficiência renal crônica, diálise peritoneal, endocardite de valva mitral nativa por S. aureus	6	4	Alta	Vancomicina, Meropenem, Gentamicina, Colistina,
ST11	F	78	Choque não especificado, politrauma da cabeça, celulite não especificada	32	11	Óbito	Cefuroxina, Vancomicina, Colistina
ST13	M	48	Politrauma não especificado, pneumotorax, transtornos do diafragma, traumatismo do estômago, fraturas múltiplas de costelas, fratura de clavícula, hemotórax, outros traumatismos de pulmão, traumatismo do baço, ópio, derrame pleural em afecções classificadas em outra parte	31	19	Alta	Nenhum
ST14	M	51	Infarto cerebral devido a embolia de artérias cerebrais, tabaco, álcool, aterosclerose de outras artérias	23	18	Alta	Nenhum
ST15	F	60	Hemorragia subaracnóidea proveniente da artéria comunicante posterior	24	21	Alta	Nenhum
S32	M	73	Transplante hepático, cirrose hepática, politrauma, craniotomia, queda de 2 m	8	8	Óbito	Nenhum
S33	M	60	Hematoma subdural agudo, HAS, DM, IAM	16	15	Óbito	Nenhum

Continua

Anexo 2: Perfil da população estudada com relação a gênero, idade, doenças de base, tempo de hospitalização, tempo de contato e desfecho **(Conclusão)**

S34	F	62	Queda de ou para fora de residência, traumatismo da traqueia torácica, fraturas múltiplas de coluna lombar e da pelve	19	8	Óbito	Colistina, Vancomicina
S35	M	22	Efeitos da corrente elétrica, amputação traumática de localização entre o ombro e o cotovelo, sequelas de hemorragia intracerebral, politrauma não especificado	29	22	Alta	Colistina, Vancomicina, Meropenem
S36	F	63	Aderências intestinais (bridas) com obstrução, deiscência de ferida cirúrgica não classificada em outra parte	13	6	Alta	Nenhum
S37	F	60	Queda escada – craniotomia pós operatória	122	19	Óbito	Vancomicina, Colistina, Anidulafungina, Meropenem
S38	M	34	AVC, não especificado como hemorrágico ou isquêmico	33	27	Óbito	Cefuroxina, Vancomicina, Colistina, Meropenem
S39	F	57	Neoplasia SNC com DVP, hernioplastia, colecistectomia, enterectomia	37	24	Óbito	Piperacilina + Tazobactam, Vancomicina, Meropenem, Colistina
S40	M	52	FAF tórax com síndrome Ogilvie e ileostomia, outros traumatismos especificados do tórax, cuidados à ileostomia, traqueostomia, outra embolia e trombose venosas	48	43	Alta	Meropenem, Fluconazol, Vancomicina, Colistina, Ciprofloxacina

Legenda: F – Feminino; M – Masculino; DM – Diabetes Mellitus; SNC – Sistema Nervoso Central; IAM – Infarto Agudo de Miocárdio; AVC – Acidente Vascular Cerebral; IC – Insuficiência cardíaca; HAS – hipertensão arterial aguda; ICS – Infecção de corrente sanguínea; ISC – infecção de sítio cirúrgico; IRA – Insuficiência renal aguda; DVE – Derivação ventricular externa; DVP – Derivação ventricular peritoneal; FAF – ferida com arma de fogo.

8.3 Anexo 3: Isolados dos casos A (Pronto Socorro, 31 de agosto de 2016), B (UP4C – UTI da Traumatologia, 12 de setembro de 2016), C (UP4C – UTI da Traumatologia, 21 de dezembro de 2016) e D (UPSCI – Unidade de Cuidados Intermediários do Pronto Socorro, 2 de janeiro de 2017) e de respectivos contactantes

Paciente	Classificação	Caso	Isolado	MacConkey + colistina (2 mg/L)	Identificação por MALDI-TOF	PCR para *mcr-1*
S14	*Swab* Caso A	A	CA	Lactose positivo	*K. pneumoniae*	Negativo
S1	Contactante	A	CA1	Lactose negativo	*P. mirabilis*	Negativo
S3	Contactante	A	CA2	Sem crescimento	-	-
S4	Contactante	A	CA3	Sem crescimento	-	-
		A	CA4	Lactose negativo	*M. morganii*	Negativo
S6	Contactante	A	CA5	Sem crescimento	-	-
S9	Contactante	A	CA6	Sem crescimento	-	-
		A	CA7	Sem crescimento	-	-
S11	Contactante	A	CA10	Lactose negativo	*P. mirabilis*	Negativo
		A	CA11	Sem crescimento	-	-
S13	Contactante	A	CA12	Lactose negativo	*E. asburiae*	Negativo
S15	Contactante	A	CA13	Sem crescimento	-	-
		A	CA14	Lactose negativo	*P. mirabilis*	Negativo
S16	Contactante	A	CA15	Lactose negativo	*Proteus vulgaris*	Negativo
		A	CA16	Sem crescimento	-	-
S17	Contactante	A	CA17	Lactose negativo	*M. morganii*	Negativo
		A	CA18	Sem crescimento	-	-
S19	Contactante	A	CA19	Sem crescimento	-	-
S20	Contactante	A	CA20	Lactose negativo	*S. marcescens*	Negativo
S21	Contactante	A	CA21	Lactose negativo	*P. mirabilis*	Negativo
S24	Contactante	A	CA22	Lactose positivo	*E. coli*	Negativo
S25	Contactante	A	CA23	Sem crescimento	-	-
S31	*Swab* Caso B	B	CB	Lactose negativo	*P. mirabilis*	Negativo
			CB’	Lactose positivo	*K. pneumoniae*	Positivo
ST1	Contactante	B	CB1	Lactose negativo	*P. stuartii*	Positivo
ST3	Contactante	B	CB2	Lactose negativo	*P. mirabilis*	Negativo
ST4	Contactante	B	CB3	Lactose positivo	*K. pneumoniae*	Negativo
ST7	Contactante	B	CB4	Sem crescimento	-	-
			CB5	Sem crescimento	-	-
ST8	Contactante	B	CB6	Sem crescimento	-	-
ST9	Contactante	B	CB7	Lactose positivo	*K. pneumoniae*	Negativo
ST11	Contactante	B	CB8	Lactose negativo	*P. mirabilis*	Negativo
			CB9	Sem crescimento	-	-

Continua

Anexo 3: Isolados dos casos A (Pronto Socorro, 31 de agosto de 2016), B (UP4C – UTI da Traumatologia, 12 de setembro de 2016), C (UP4C – UTI da Traumatologia, 21 de dezembro de 2016) e D (UPSCI – Unidade de Cuidados Intermediários do Pronto Socorro, 2 de janeiro de 2017) e de respectivos contactantes **(Conclusão)**

ST13	Contactante	B	CB10	Lactose negativo	*K. pneumoniae*	Negativo
ST14	Contactante	B	CB11	Lactose positivo	*K. pneumoniae*	Negativo
ST15	Contactante	B	CB12	Sem crescimento	-	-
			CB13	Lactose negativo	*M. morganii*	Positivo
S37	*Swab* Caso C	C	CC	Lactose positivo	*K. aerogenes*	Positivo
			CC’	Lactose positivo	*K. pneumoniae*	Negativo
S32	Contactante	C	CC1	Lactose negativo	*S. marcescens*	Negativo
S33	Contactante	C	CC2	Lactose positivo	*K. pneumoniae*	Negativo
S34	Contactante	C	CC3	Lactose negativo	*P. mirabilis*	Negativo
S35	Contactante	C	CC4	Lactose positivo	*K. pneumoniae*	Positivo
			CC5	Sem crescimento	-	-
S39	*Swab* Caso D	D	CD	Lactose negativo	*P. mirabilis*	Positivo
S38	Contactante	D	CD1	Sem crescimento	-	-
			CD2	Lactose negativo	*P. aeruginosa*	Negativo
S40	Contactante	D	CD3	Lactose negativo	*K. quasipneumoniae**	Positivo

Legenda: *Identificado como *K. pneumoniae* por MALDI-TOF e reclassificado como *K. quasipneumoniae* por sequenciamento total do genoma.

8.4 Anexo 4: Alinhamento dos amplicons gerados por sequenciamento Sanger dos isolados CB', CB13p, CC, CC4 e CD com fragmento alvo de 309pb do gene *mcr-1*, de CB' com o gene *ICR^{Mo}* e dos 5 amplicons entre si

```
                                                                  1         10
CB'_Sanger/1-234    ........................................TTCTGA.CGCGACCGCC.ATC
mcr-1_309pb/1-309   CGGTCAGTCCGTTTGTTCTTGTGGCGAGTGTTGCCGTTTTCTTGACCGCGACCGCCAATC

                   20        30        40        50        60        70
CB'_Sanger/1-234    TTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGC
mcr-1_309pb/1-309   TTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGC

                   80        90       100       110       120       130
CB'_Sanger/1-234    TGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGT
mcr-1_309pb/1-309   TGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGT

                  140       150       160       170       180       190
CB'_Sanger/1-234    ATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTT
mcr-1_309pb/1-309   ATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTT

                  200       210       220       230
CB'_Sanger/1-234    ATTTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATACG.........................
mcr-1_309pb/1-309   ATTTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAGA

CB'_Sanger/1-234    .........
mcr-1_309pb/1-309   CCGACCAAG
```

```
                    1         10        20                  30        40        50
CB13p_Sanger/1-306  CCTGGTCGGCAGTCCGTTTGTTCTG.....GAGAGGTTCCGTTTT.TTGACCGCGACCGC
mcr-1_309pb/1-309   ..CGGT...CAGTCCGTTTGTTCTTGTGGCGAGTGTTGCCGTTTTCTTGACCGCGACCGC

                        60        70        80        90       100       110
CB13p_Sanger/1-306  CAATCTTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTT
mcr-1_309pb/1-309   CAATCTTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTT

                       120       130       140       150       160       170
CB13p_Sanger/1-306  TGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTAATGATCACCACGCTGTTATC
mcr-1_309pb/1-309   TGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATC

                       180       190       200       210       220       230
CB13p_Sanger/1-306  ATCGTATCG.TATGTGCTAAAGCCTGAGTAGATTTAAATATTAATCATGGGCGCGGTGAC
mcr-1_309pb/1-309   ATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGGTGAC

                       240       250       260       270       280       290
CB13p_Sanger/1-306  CAGTTAAGTTACTGACACATATGG.ACGGTCTATGATACGACTATGCTCCAAAATGCCCT
mcr-1_309pb/1-309   CAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCT

                       300
CB13p_Sanger/1-306  AC.GACCGACCAAGA
mcr-1_309pb/1-309   ACAGACCGACCAAG.
```

```
                                                 1         10        20        30
CC_Sanger/1-246     ............................GTTCCAGTTTT.TTGACCGCGACCGCCAATC
mcr-1_309pb/1-309   CGGTCAGTCCGTTTGTTCTTGTGGCGAGTGTTGCCGTTTTCTTGACCGCGACCGCCAATC

                        40        50        60        70        80        90
CC_Sanger/1-246     TTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTCGTGC
mcr-1_309pb/1-309   TTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGC

                       100       110       120       130       140       150
CC_Sanger/1-246     TGACGATCGCAGTCGTGCTATTTGGCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGT
mcr-1_309pb/1-309   TGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGT

                       160       170       180       190       200
CC_Sanger/1-246     ATCGCTAAGGGCTAAAGCCTGAGTTGAGTTAAATATTAATCATGGGCGCGG.GACCAGTT
mcr-1_309pb/1-309   ATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTT

                  210       220       230       240
CC_Sanger/1-246     AAGTTACGGACACTTAAGGCACGGTGTATGAT............................
mcr-1_309pb/1-309   ATTTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAGA

CC_Sanger/1-246     ....CGGAG
mcr-1_309pb/1-309   CCGACCAAG
```

Continua

Anexo 3: Alinhamento dos amplicons gerados por sequenciamento Sanger dos isolados CB', CB13p, CC, CC4 e CD com fragmento alvo de 309pb do gene *mcr-1*, de CB' com o gene *ICR^Mo* e dos 5 amplicons entre si **(Continuação)**

```
                                                  1         10        20        30
CC4_Sanger/1-245   ..............................TTACAGTTTTCGTTGACCGAACCCGCCAAT
mcr-1_309pb/1-309  CGGTCAGTCCGTTTGTTCTTGTGGCGAGTGTTGCCGTTTTC.TTGACCGCGACCGCCAAT

                              40        50        60        70        80
CC4_Sanger/1-245   .TTACCTCAGTGGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTCGGG
mcr-1_309pb/1-309  CTTACCTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTG

                 90       100       110       120       130       140
CC4_Sanger/1-245   CTGACGAGGACAGTCGTACTATTTGGCGCGATTATCATGATCACCACGCTGTCATCATCG
mcr-1_309pb/1-309  CTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCG

                150       160       170       180       190       200
CC4_Sanger/1-245   AACATAAAAGGTCCAAAACCTGAGTAGAGATTGAAAGGAAATCAAGGCGCGGAGACCAGA
mcr-1_309pb/1-309  TATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGT

                210       220       230            240
CC4_Sanger/1-245   GGAGGTGCTGACAGTTAAGGAGCG....AGGAGACGGGGA....................
mcr-1_309pb/1-309  TATTTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAG

CC4_Sanger/1-245   ..........
mcr-1_309pb/1-309  ACCGACCAAG
```

```
                                                  1         10        20
CD_Sanger/1-238    ....................................GTTTTGTTGACCGCGACCGCCAATC
mcr-1_309pb/1-309  CGGTCAGTCCGTTTGTTCTTGTGGCGAGTGTTGCCGTTTTCTTGACCGCGACCGCCAATC

                   30        40        50        60        70        80
CD_Sanger/1-238    TTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGC
mcr-1_309pb/1-309  TTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGC

                   90       100       110       120       130       140
CD_Sanger/1-238    TGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGT
mcr-1_309pb/1-309  TGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGT

                  150       160       170       180       190       200
CD_Sanger/1-238    ATCG.TATGTGCTAAAGCCTGAGTTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGG.GACCAGTT
mcr-1_309pb/1-309  ATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTT

                      210       220       230
CD_Sanger/1-238    AAGTTACGGACACTTATGGCACGGTGTAGTCGACG.........................
mcr-1_309pb/1-309  ATTTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAGA

CD_Sanger/1-238    .........
mcr-1_309pb/1-309  CCGACCAAG
```

```
                                                                        1
CB'_Sanger/1-234   ............................................................TTCTGAC.
ICR^Mo/1-1677      TGGCGTCAGCAAGGTATTAATGCTTATGTGATGATGGGTATTGTCGCGCTATTTTTGACC

                   10        20        30        40        50        60
CB'_Sanger/1-234   GCGACCGCC.ATCTTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAAT
ICR^Mo/1-1677      CTAACCGCCAATATTACTTTCTTTGATAAAGCCACGGAAGTCTATCCGTTTGCCCAGCAT

                   70        80        90       100       110       120
CB'_Sanger/1-234   CTCGGCTTTGT..GCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCA
ICR^Mo/1-1677      ATTGGGTTTATAGGCTCATTGCCGTTG..GTGCTATTCGGTGTCATGCTACTGGTTATTG

                  130       140       150       160           170       180
CB'_Sanger/1-234   CGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGA...TTTTGCTATTAATCA
ICR^Mo/1-1677      TGCTGC..TCAGC.TATCGTTACACCCTTAAAGCGGTATTGATTTTTTTGCTATTGACCG

                      190       200       210       220       230
CB'_Sanger/1-234   TGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATACG.......
ICR^Mo/1-1677      CG...GCAGTCACGGCGTATTTTACTGATACTTATGGCACTGTCTATGATGTCAATATGC
```

Continua

Anexo 3: Alinhamento dos amplicons gerados por sequenciamento Sanger dos isolados CB', CB13p, CC, CC4 e CD com fragmento alvo de 309pb do gene *mcr-1*, de CB' com o gene *ICR*^{Mo} e dos 5 amplicons entre si **(Conclusão)**

```
                                                1                                   10         20
CB'_Sanger/1-234      ......................TTCTGA..............CGCGACCGCC.ATCT
CB13p_Sanger/1-306    CCTGGTCGGCAGTCCGTTTGTTCTGGAGAGGTTCCGTTTTTTGACCGCGACCGCCAATCT
CC_Sanger/1-246       ......................GTTCCAG..........TTTTTTGACCGCGACCGCCAATCT
CC4_Sanger/1-245      ......................TTACAG........TTTTCGTTGACCGAACCGCCAAT.T
CD_sanger/1-238       ......................GTTTTG..............TTGACCGCGACCGCCAATCT

                                  30         40         50         60         70         80
CB'_Sanger/1-234      TACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCT
CB13p_Sanger/1-306    TACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCT
CC_Sanger/1-246       TACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTCGTGCT
CC4_Sanger/1-245      TACCTCAGTGGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTCGGGCT
CD_sanger/1-238       TACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCT

                                  90        100        110        120        130        140
CB'_Sanger/1-234      GACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTA
CB13p_Sanger/1-306    GACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTAATGATCACCACGCTGTTATCATCGTA
CC_Sanger/1-246       GACGATCGCAGTCGTGCTATTTGGCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTA
CC4_Sanger/1-245      GACGAGGACAGTCGTACTATTTGGCGCGATTATCATGATCACCACGCTGTCATCATCGAA
CD_sanger/1-238       GACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTA

                                 150        160        170        180        190        200
CB'_Sanger/1-234      TCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTA
CB13p_Sanger/1-306    TCG.TATGTGCTAAAGCCTGAGTAGATTTAAATATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTA
CC_Sanger/1-246       TCGCTAAGGGCTAAAGCCTGAGTTGAGTTAAATATTAATCATGGGCGCGG.GACCAGTTA
CC4_Sanger/1-245      CATAAAAGGTCCAAAACCTGAGTAGAGATTGAAAGGAAATCAAGGCGCGGAGACCAGAGG
CD_sanger/1-238       TCG.TATGTGCTAAAGCCTGAGTTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGG.GACCAGTTA

                                 210        220        230
CB'_Sanger/1-234      TTTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATACG............................
CB13p_Sanger/1-306    AGTTACTGACACATATGG.ACGGTCTATGATACGACTATGCTCCAAAATGCCCTACGACC
CC_Sanger/1-246       AGTTACGGACACTTAAGGCACGGTGTATGATCGGAG..........................
CC4_Sanger/1-245      AGGTGCTGACAGTTAAGGAGCG....AGGAGACGGGGA........................
CD_sanger/1-238       AGTTACGGACACTTATGGCACGGTGTAGTCGACG............................

CB'_Sanger/1-234      ........
CB13p_Sanger/1-306    GACCAAGA
CC_Sanger/1-246       ........
CC4_Sanger/1-245      ........
CD_sanger/1-238       ........
```

8.5 Produção Científica

8.5.1 Artigo publicado como colaborador

Infection
https://doi.org/10.1007/s15010-019-01309-2

CASE REPORT

Simultaneous colonization by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* harboring *mcr-1* in Brazil

Lauro Vieira Perdigão Neto[1,6] · Louise Corscadden[2] · Roberta Cristina Ruedas Martins[3] · Débora Satie Nagano[3] · Marcos Paulo Vieira Cunha[4] · Patrícia Regina Neves[3] · Lucas Augusto Moyses Franco[1] · Maria Luísa Nascimento Moura[1] · Camila Fonseca Rizek[3] · Thais Guimarães[1] · Ícaro Boszczowski[1] · Flávia Rossi[5] · Anna S. Levin[1,3] · Richard A. Stabler[2] · Silvia F. Costa[3]

Received: 21 November 2018 / Accepted: 17 April 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Case presentation We present a case report of a woman, concurrently colonized by polymyxin-resistant *E. coli* and *K. pneumoniae*. A Brazilian female patient, in her mid-fifties, was hospitalized with schistosomiasis. During hospitalization, polymyxin-resistant *E. coli* and *K. pneumoniae* were isolated from surveillance cultures.

Methods Identification, antimicrobial susceptibility testings, PCR for *mcr-1*, plasmid transfer by conjugation and whole genome sequencing were performed.

Results *E. coli* ST744 and *K. pneumoniae* ST101 carrying *mcr*-1 gene were described. Transconjugant *E. coli* was positive for *mcr-1* and IncX4 by PCR. The plasmid is a 33,304-base pair plasmid, and the *mcr-1* gene was the only antimicrobial resistance gene present in the plasmid.

Conclusions This study presents a case report of a hospitalized woman, concurrently colonized by *mcr-1*-harboring *E. coli* ST744, a different ST from previously described in Brazil, and a *K. pneumoniae* ST101.

Keywords Antimicrobial susceptibility · mcr-1 · Resistance · Colistin

Polymyxins are peptide antimicrobials active against most Gram-negative bacteria, and multidrug resistance and slowdown in antibiotic discoveries were responsible for the clinical return of this class of antimicrobials. Unfortunately, recent data have shown a significant increase in the number of isolates with high minimum inhibitory concentration for polymyxins against Gram-negative microorganisms, especially *Klebsiella pneumoniae* [1]. Until recently, polymyxin resistance had involved only vertical transmission due to chromosomal mutations, but a novel plasmidial colistin resistance gene (*mcr-1*) was identified, which can lead to horizontal transmission [2]. Most *mcr-1*-positive isolates origin from food animals and meat, with only a few clinical isolates reported [3]. The gene has previously been identified in Brazil [4], but this report is important due to co-colonization of *mcr-1*-harboring distinct species.

A female patient, in her mid-fifties, was hospitalized in March 2016 with schistosomiasis. She was born and lived in a rural town in the state of Paraiba, Northeastern Brazil. Her main diet was foods she produced, including chickens and pigs fed only locally sourced natural food. Three months before admission, she moved to São Paulo in search of medical care. In the third week after admission, she developed

✉ Lauro Vieira Perdigão Neto
lauro_perdigao@hotmail.com

1 Hospital das Clínicas, University of São Paulo, Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225, Sala 629, São Paulo, SP 05403-010, Brazil

2 Department of Infectious and Tropical Diseases, School of Hygiene and Tropical Medicine, London WC1E 7HT, UK

3 Department of Infectious Diseases and LIM-54, University of São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, São Paulo, SP 05403-000, Brazil

4 School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, São Paulo, SP 05508-270, Brazil

5 Microbiology Laboratory, Hospital das Clínicas, University of São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, São Paulo, SP 05403-000, Brazil

6 Rua Arruda Alvim, 107, #142, São Paulo, SP 05410-020, Brazil

Published online: 25 April 2019

8.5.3 Resumo publicado como colaborador

Journal of INFECTION CONTROL
ISSN 2316-5124 | Ano VII , Volume 7 , Número 3 , 2018

XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE CONTROLE DE INFECÇÃO E EPIDEMIOLOGIA HOSPITALAR

> ACESSE AQUI A REVISTA ONLINE

Código do Trabalho: *13110*

RESISTÊNCIA À COLISTINA MEDIADA POR MCR-1 EM ESCHERICHIA COLI CAUSANDO INFECÇÕES COMUNITÁRIAS: DEVEMOS TESTAR ROTINEIRAMENTE?

Autores: *Yrving Lucas Vasconcelos E Patva[1]; Thaís Guimarães[2]; Roberta Cristina Ruedas Martins[1]; André Luis Franco Cotia[4]; Débora Satie Nagano[3]; Juliana Januário Gaudereto[6]; Anna Silva Machado[7]; Silvia Figuetredo Costa[8]; Lauro Vieira Perdigão Neto[9].*

1. Hospital Geral De Guarulhos, Guarulhos - SP - Brasil; 2. Hospital Do Servidor Público Estadual De São Paulo, São Paulo - SP - Brasil; 3. Departamento De Moléstias Infecciosas E Parasitárias Da Faculdade De Medicina Da Usp, São Paulo - SP - Brasil; 4. Instituto De Infectologia Emílio Ribas, São Paulo - SP - Brasil; 5. Aluna De Mestrado Da Faculdade De Medicina Da Universidade De São Paulo, São Paulo - SP - Brasil; 6. Departamento De Doenças Infecciosas, Faculdade De Medicina, Universidade De São Paulo, São Paulo - SP - Brasil; 7. Hospital Totalcor, São Paulo - SP - Brasil; 8. Faculdade De Medicina Da Universidade De São Paulo, São Paulo - SP - Brasil; 9. Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da Universidade De São Paulo, São Paulo - SP - Brasil.

Introdução: O aumento progressivo da resistência bacteriana somado a falta de novos agentes antimicrobianos é atualmente uma das maiores ameaças à saúde global. A colistina possui ação de amplo espectro contra bactérias Gram negativas, incluindo enterobactérias. Foi reintroduzida no arsenal terapêutico devido ao aumento na resistência a outras classes. Em 2015, na China, foi detectada pela primeira vez resistência plasmidial à colistina, mediada pelo gene *mcr-1* em *Escherichia coli*. Posteriormente surgiram relatos evidenciando sua presença em animais, alimentos, ambientes aquáticos e hospitalar. **Objetivo:** Descrever a detecção de *mcr-1* em *Escherichia coli* resistentes à colistina causando infecção em humanos no Brasil. **Método:** Foram identificadas sete *Escherichia coli* resistentes à colistina de pacientes em três hospitais na cidade de São Paulo, entre março/2016 e janeiro/2018. Cinco cepas foram isoladas de infecção urinária. Os dados referentes às características clínicas e epidemiológicas foram coletados dos prontuários. Os perfis de sensibilidade antimicrobiana foram realizados por Sensititre e microdiluição em caldo. O gene *mcr-1* foi detectado por reação em cadeia da polimerase. Os isolados foram submetidos ao Sequenciamento Completo do Genoma. Montagens *de novo* foram realizadas usando o SPAdes v.3.10.1. A sequência tipo, plasmídeos e genes de resistência e virulência foram identificados utilizando ferramentas de bioinformática. Mutações associadas à resistência à colistina foram verificadas com Artemis e Blast2Seq. Foi realizado ensaio de conjugação utilizando a cepa *Escherichia coli* C600 como receptora. **Resultados:** O gene *mcr-1* foi detectado em todas as cepas. A idade média dos pacientes foi 64 anos. Quatro amostras foram coletadas em até 24h da admissão. Um dos pacientes foi previamente exposto à zona rural. **Discussão:** As sete cepas possuíam sequência tipo diferentes. Destas, seis já foram identificadas com *mcr-1* em outros países. No Brasil, há relato apenas da sequência tipo 10 com *mcr-1*, encontrada em carnes de supermercados da cidade de São Paulo. Em nosso estudo, o paciente em que foi isolado a sequência tipo 10 trabalhava num armazém de alimentos de uma rede de supermercados. A sequência tipo 57 é descrita pela primeira vez com *mcr-1* nesse estudo. Dados sobre o uso das polimixinas na veterinária e a prevalência da resistência a esse antimicrobiano no Brasil são escassos. Na medicina, sabemos que seu uso vem aumentando, devido ao crescimento concomitante de infeções por agentes multirresistentes, restando como opção terapêutica na maioria dos casos, os aminoglicosídeos e as polimixinas. A crescente detecção de *mcr-1* levanta um alerta, visto que este pode estar presente em agentes de infecções comunitárias, evidenciando a necessidade de realização de testes de sensibilidade à colistina, rotineiramente.

8.5.3 Participação em Congresso

Abstract apresentado no **28th Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases** (ECCMID 2018). **21 April 2018 - 24 April 2018 – Madrid**

Título: Evaluating the circulation of the *mcr-1* gene in hospital settings

Autores: Débora Satie Nagano; Roberta Cristina Ruedas Martins; Lucas Augusto Moyses Franco; Andrea Micke Moreno; Luisa Moreno; Thais Guimaraes; Matias Salomão; Lauro Perdigão; Camila Rizek; Sânia Santos; Flávia Rossi; Anna Sara Levin; Silvia Figueiredo Costa

Abstract apresentado no **29th Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases** (ECCMID 2019). **13 April 2019 - 16 April 2019 – Amsterdam**

Título: *mcr-1*-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* causing community-acquired infections: should we routinely test colistin for urine samples in the emergency department?

Autores: Yrving Lucas Vasconcelos E Paiva, Débora Satie Nagano, Roberta Cristina Ruedas Martins, André Cotia, Thais Guimaraes, Lauro Perdigão Neto, Anna Machado, Lucas Augusto Moyses Franco, Alexandre Inacio de Paula, Patricia Regina Neves, Louise Corscadden, Anna Sara Levin, Silvia Figueiredo Costa

9. Referências

1. Abat C, Desboves G, Olaitan AO, Chaudet H, Roattino N, Fournier PE, Colson P, Raoult D, Rolain JM. Increasing burden of urinary tract infections due to intrinsic colistin-resistant bacteria in hospitals in Marseille, France. *Int J Antimicrob Ag*. 2015; 45: 144-150.

2. Aghapour Z, Gholizadeh P, Ganbarov K, Bialvaei AZ, Mahmood SS, Tanomand A, Yousefi M, Asgharzadeh M, Yousefi B, Kafil HS. Molecular mechanisms related to colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Infection and Drug Resistance*. 2019; 12: 965-75.

3. Aires CAM, da Conceição-Neto OC, Tavares E Oliveira TR, Dias CF, Montezzi LF, Picão RC, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef APD. Emergence of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 jul; 61(7): 1-3.

4. Aquilini E, Merino S, Knirel YA, Regué M, Tomás JM. Functional identification of *Proteus mirabilis eptC* gene encoding a core lipopolysaccharide phosphoethanolamine transferase. *Int J Mol Sci*. 2014 abr; 15: 6689-6702.

5. Banu H, Prasad KP. Role of Plasmids in microbiology. *J Aquac Res Development*. 2017; 8(1): 1-8.

6. Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 dez; 48(6): 583-591.

7. Baron S e Rolain JM. Efflux pump inhibitor CCCP to rescue colistin susceptibility in *mcr-1* plasmid-mediated colistin-resistant strains and

Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2018 jul; 73(7): 1862-71.

8. Bedenić B, Vranić-Ladavac M, Venditti C, Tambić-Andrašević A, Barišić N, Gužvinec M, Karčić N, Petrosillo N, Ladavac R, di Caro A. Emergence of colistin resistance in *Enterobacter aerogenes* from Croatia. *J Chemother*. 2018 abr; 30(2): 120-123.

9. Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Rolain JM. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev. Anti Infec. Ther*. 2012; 10(8): 917-934.

10. Blair JMA, Richmond GE, Piddock LJV. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2014; 9(10): 1165-77.

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

12. Carattoli A, Zankari EA, García-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, Aarestrup FM, Hasman H. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 jul; 58(7): 3895-3903.

13. Cavaco L, Mordhorst H, Hencriksen R. PCR for plasmid-mediated colistin resistance genes, mcr-1 and mcr-2 (multiplex). *DTU Food National Food Institute Laboratory Protocol*. 2016 oct; (2) 1-8.

14. Dean AG, Arner TG, Sunki GG, Friedman R, Lantinga M, Sangam S, Zubieta JC, Sullivan KM, Brendel KA, Gao Z, Fontaine N, Shu M, Fuller G, Smith DC, Nitschke DA, Fagan RF. Epi Info™, a database and statistics program for public health professionals. *CDC*, Atlanta, GA, USA, 2011.

15. Cheng YH, Lin TL, Lin YT, Wang JT. Amino acid substitutions of CrrB responsible for resistance to colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 jun; 60(6): 3709-16.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth-first Information Supplement, CLSI document M100-S21, Wayne, Pennsylvania. 2018.

17. Conceição-Neto OC, Aires CAM, Pereira NF, Silva LHJ, Picão RC, Siqueira BN, Albano RM, Asensi MD. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 ago; 50(2): 282-284.

18. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev*. 1988 set; 52(3): 375-95.

19. Dalmolin TV, Castro L, Mayer FQ, Zavascki AP, Martins AF, Lima-Morales D, Barth AL. Co-ocurrence of *mcr-1* and bla_{KPC-2} in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2017 ago; 72(8): 2404-6.

20. Dalmolin TV, Martins AF, Zavascki AP, de Lima-Morales D, Barth AL. Acquisition of the mcr-1 gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017; 90(2): 132-133.

21. Davies J e Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010 set; 74(3): 417-433.

22. Drali R, Berrazeg M, Zidouni LL, Hamitouche F, Abbas AA, Deriet A, Mouffok F. Emergence of mcr-1 plasmid-mediated colistin-resistant Escherichia coli isolates from seawater. *Sci Total Environ*. 2018 nov; 642: 90-94.

23. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical breakpoints – bacteria (v 8.1), EUCAST, Basel. 2018.

24. Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MC, Moura Q, Pérez-Chaparro PJ, Esposito F, Sartori L, Dropa M, Matté MH, Lira DPA, Mamizuka EM, Lincopan N. 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 set; 60(10): 6415-7.

25. Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, Lopes R, Otutumi LK, Gonçalves DD, Dropa M, Matté MH, Monte DF, Landgraf M, Francisco GR, Bueno MF, Garcia DO, Knöbl T, Moreno AM, Lincopan N. Silent dissemination of colistin-resistant *Eschirichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro Surveill*. 2016 abr; 21(17): 1-6.

26. Fernandes MR, Sellera FP, Esposito F, Sabino CP, Cerdeira L, Lincopan N. Colistin-resistant *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* on public beaches, an infectious threat emerging in recreational waters. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 jun; 61(7): 1-4.

27. Fiol FSD, Lopes LC, Toledo MI, Barberato-Filho S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010 jan-fev; 43(1): 68-72.

28. Gould JM. The Epidemiology of antibiotic resistance. *Int J of Antimicrob Agents*. 2008 nov; 32 Suppl 1: S2-S9.

29. Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. Antibióticos: Importância e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím. Nova*. 2010; 33(3): 667-679.

30. Hadjadj L, Riziki T, Zhu Y, Li J, Diene SM, Rolain JM. Study of mcr-1 gene-mediated colistin Resistance in *Enterobacteriaceae* isolated from humans and animals in different countries. *Genes (Basel).* 2017 dez; 8(12) pii: 394: 1-16.

31. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposyum Series*. 1999; 41(41): 95-98.

32. Hawkey, PM. The Growing burden of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2008 set; 62 Suppl 1: i1-9.

33. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2009 set; 64 Suppl 1: i3-10.

34. Hayakawa K, Marchaim D, Divine GW, Pogue JM, Kumar S, Lephart P, Risko K, Sobel JD, Kaye KS. Growing prevalence of *Providencia stuartii* associated with the increased usage of colistin at a tertiary health care center. *Int J Infec Dis*. 2012 set; 16(9): 1-8.

35. Higashino HR, Marchi AP, Martins RCR, Batista MV, Neto LVP, Lima VACC, Rossi F, Guimarães T, Levin AS, Rocha V, Costa SF. Colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-harboring KPC and MCR-1 in a Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit. *Bone Marrow Transplant*. 2018 nov.

36. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Villegas MV, Dubois V, Poirel L. High-level resistance to colistin mediated by various mutations in the *crrB* gene among carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 out; 61(11): 1-17.

37. Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo P, Tsang KK, Lago BA, Dave BM, Pereira S, Sharma AN, Doshi S, Courtot M, Lo R, Williams LE, Frye JG, Elsayegh T, Sardar D, Westman EL, Pawlowski AC, Johnson

TA, Brinkman FS, Wright GD, McArthur AG. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 2017 jan; 45(D1): D566-573.

38. Johnson TJ, Bielak EM, Fortini D, Hansen LH, Hasman H, Debroy C, Nolan LK, Carattoli A. Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Plasmid*. 2012 jul; 68(1): 43-50.

39. Kempf I, Jouy E, Chauvin. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 dez; 48(6): 598-606.

40. Kieffer N, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Poirel L. High rate of MCR-1-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among pigs, Portugal. *Emerg Infect Dis*. 2017 dez; 23(12): 2023-29.

41. Kieffer N, Nordmann P, Moreno AM, Zanolli Moreno L, Chaby R, Breton A, Tissières P, Poirel L. Genetic and functional characterization of an MCR-3-like enzyme-producing *Escherichia coli* isolate recovered from swine in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 jun; 62(7): 1-18.

42. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018 jun; 35(6): 1547-49.

43. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*. 2012 abr; 50(4): 1355-61.

44. Le J, Turner N, Deshpande LM, Davis AP, Castanheira M. Case report of transient mcr-1-haboring Escherichia coli with concurrent Staphylococcus

aureus bacteremia in Long Beach, California. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017 dez; 89(4): 303-304.

45. Lei L, Wang Y, Ou Y, Wu Y, Li M, Shen Z. *mcr-1* in *Enterobacteriaceae* from Companion Animals, Beijing, China, 2012–2016. *Emerging Infect Dis*. 2017 abr; 23(4): 710-711.

46. Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2015 abr; 28(2): 337-418.

47. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. 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 fev; 16(2): 161-8.

48. Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an intensive web interface. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47: D687-D692.

49. Loayza MF, Salinas L, Villavicencio F, Rafael T, Salas S, Villacís J, Satan C, Ushiña L, River R, Muñoz O, Zurita J, Natahlie T, Melano R, Reyes J, Trueba G. Diverse *Escherichia coli* lineages, from domestic animals and humans in a household, carry colistin resistance gene *mcr-1* in Ecuador. *bioRxiv*. 2018 jun: 1-16.

50. 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 jul-ago; 22(4): 356-357.

51. Loureiro RJ, Roque F, Rodrigues AT, Herdeiro MT, Ramalheira E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Rev Port Saúde Pública*. 2016 jan-abr; 34(1): 77-84.

52. Maggi B. Instrução Normativa nº45, de 22 de novembro de 2016. Diário Oficial da União – Seção 1. 2016, 229, p. 6. Disponível em: http://www.lex.com.br/legis_27231571_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_45_DE_22_DE_NOVEMBRO_DE_2016.aspx.

53. Meinersmann RJ, Ladely SR, Plumblee JR, Cook KL, Thacker E. Prevalence of *mcr-1* in the cecal contents of food animals in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 jan; 61(2): 1-4.

54. Mendes AC, Novais A, Campos J, Rodrigues C, Santos C, Antunes P, Ramos H, Peixe L. *mcr-1* in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients, Portugal, 2016-2017. *Emerg Infect Dis*. 2018 abr; 24(4): 762-66.

55. Monte DF, Fernandes MR, Cerdeira L, de Souza TA, Mem A, Franco BDGM, Landgraf M, Lincopan N. Draft genome sequences of colistin-resistant MCR-1-producing *Escherichia coli* ST1850 and ST74 strains isolated from commercial chicken meat. *Genome Announc*. 2017 mai; 5(20): 1-2.

56. Monte DF, Mem A, Fernandes MR, Cerdeira L, Esposito F, Galvão JA, Franco BDGM, Lincopan N, Landgraf M. Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying *mcr-1* genes in South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 abr; 61(5): 1-4.

57. Neto LPV, Corscadden L, Martins RCR, Nagano DS, Cunha MPV, Neves PR, Franco LAM, Moura MLN, Rizek CF, Guimarães T, Boszczowski I, Rossi F, Levin AS, Stabler RA, Costa SF. Simultaneous colonization by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* harboring *mcr-1* in Brazil. *Infection*. 2019 abr: 1-4.

58. Ni W, Li Y, Guan J, Zhao J, Cui J, Wang R, Liu Y. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 abr; 60(5): 3215-8.

59. Nishino Y, Shimojima Y, Suzuki Y, Ida M, Fukui R, Kuroda S, Hirai A, Sadamasu K. Detection of the mcr-1 gene in colistin-resistant Escherichia coli from retail meat in Japan. *Microbiol Immunol*. 2017 dez; 61(12): 554-7.

60. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. A universal culture medium for screening polymyxin-resistant Gram-negative isolates. *J Clin Microbiol*. 2016 mai; 54(5): 1395-9.

61. Norgan AP, Freese JM, Tuin PM, Cunningham SA, Jeraldo PR, Patel R. Carbapenem- and colistin-resistant *Enterobacter cloacae* from Delta, Colorado, in 2015. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 abr; 60(5): 3141-4.

62. Norman A, Hansen LH, Sorensen SJ. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009 ago; 364(1527): 2275-89.

63. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014 nov; 5(643): 1-18.

64. Ortega-Paredes D, Barba P, Zurita J. Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the *mcr-1* gene in Ecuador. *Epidemiol Infect*. 2016 out; 144(14): 2967-70.

65. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengocchea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 jan; 54(1): 177-83.

66. Palmeira JD, Ferreira H, Madec JY, Haenni M. Draft genome of a ST443 *mcr-1*- and *bla*$_{CTX-M-2}$-carrying *Escherichia coli* from cattle in Brazil. J Glob Antimicrob Resist. 2018, 13, 269-270.

67. Partridge SR. Resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Pathology*. 2015 abr; 47(3): 276-284.

68. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromossomes. *Clinical Microbiology Reviews*. 2017 abr; 30(2): 557-596.

69. Poirel L, Larpin Y, Dobias J, Stephan R, Decousser JW, Madec JY, Nordmann P. Rapid Polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance mediated by the *mcr-1/mcr-2* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018 jan; 90(1): 7-10.

70. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pederson SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, Guerra B, Malorny B, Borowiak M, Hammerl JA, Battisti A, Franco A, Alba P, Perrin-Guyomard A, Granier SA, Escobar CF, Malhotra-Kumar S, Villa L, Carattoli A, Hendriksen RS. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1, mcr-2, mcr-3 mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveill*. 2018 fev; 23(6): 1-11.

71. Robert X e Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* 2014 jul; 42: W320-4.

72. Rocha IV, Andrade CADN, Campos TL, Rezende AM, Leal NC, Vidal CFL, Xavier DE. Ciprofloxacin-resistant and extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* ST410 strain carrying the *mcr-1* gene associated with bloodstream infection. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 mai; 49(5): 655-656.

73. Rossi F, Girardello R, Morais C, Cury AP, Martins LF, da Silva AM, Abdala E, Setubal JC, da Silva Duarte AJ. Plasmid-mediated *mcr-1* in carbapenem-susceptible *Escherichia coli* ST156 causing a blood infection: an unnoticeable spread of colistin resistance in Brazil? *Clinics (Sao Paulo)*. 2017 out; 72(10): 642-644.

74. Ruppé E, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care*. 2015, 5(21): 1-15.

75. Samonis G, Korbila IP, Maraki S, Michailidou I, Vardakas KZ, Kofteridis D, Dimopoulou D, Gkogkozotou VK, Falagas ME. Trends of isolation of intrinsically resistant to colistin *Enterobacteriaceae* and association with colistin use in a tertiary hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017 set; 33(9): 1505-10.

76. Sekyere JO e Amoako DG. Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) reverses resistance to colistin, but not to tigecycline in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Front Microbiol.* 2017 fev; 14(8): 1-9.

77. Sellera FP, Fernandes MR, Sartori L, Carvalho MPN, Esposito F, Nascimento CL, Dutra GHP, Mamizuka EM, Pérez-Chaparro PJ, McCulloch JA, Lincopan N. *Escherichia coli* carrying IncX4 plasmid-mediated *mcr-1* and $bla_{CTX\text{-}M}$ genes in infected migratory Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *J Antimicrob Chemother*. 2017 abr; 72(4): 1255-56.

78. Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C. Early emergence of Escherichia coli from food-producing animals. *Lancet Infect Dis*. 2016, 16, 3, p293.

79. Sherry N, Howden B. Emerging Gram-negative resistance to last-line antimicrobial agents Fosfomycin, colistin and ceftazidime-avibactam – epidemiology, laboratory detection and treatment implications. *Expert Rev Anti-Infective Therapy.* 2018, 16, 4, 289-306.

80. Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers Microbiol*. 2015, 6, 242, 16p.

81. Stogios PJ, Cox G, Zubyl HL, Evdokimova E, Wawrzak Z, Wright GD, Savchenko A. Substrate recognition by colistin resistance enzyme from *Moraxella catarrhalis*. *ACS Chem Biol*. 2018 mai; 13(5): 1322-32.

82. Summers DK. The biology of plasmids. Londres: *Blackwell Science Ltd*; 1996.

83. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 out; 453(2): 254-67.

84. Tian GB, Doi Y, Shen J, Walsh TR, Wang Y, Zhang R, Huang X. MCR-1-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in China. *Lancet Infect Dis*. 2017 jun; 17(6): 577.

85. Walsh TR e Wu Y. China bans colistin as a feed additive for animals. *Lancet Infect Dis*. 2016 out; 16(10): 1102-1103.

86. Wang Y, Tian GB, Shen Y, Tyrrell JM, Huang X, Zhou H, Li HY, Doi Y, Gand Y, Ren H, Zhong LL, Shen Z, Zeng KJ, Wang S, Liu JH, Wu C, Walsh TR, Shen J. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive *Enterobacteriaceae* in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis*. 2017 apr; 17(4): 390-399.

87. Wang X, Zhai W, Li J, Liu D, Zhang Q, Shen Z, Wang S, Wang Y. Presence of *mcr-3* variant in *Aeromonas caviae*, *Proteus mirabilis*, and *Escherichia coli* from one domestic duck. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2018 jan; 62(2): 1-8.

88. Wang R, Dorp Lv, Shaw LP, Bradley P, Wang Q, Wang X, Jin L, Zhang Q, Rieux A, Dorai-Scheniders T, Weinert LA, Iqbal Z, Didelot X, Wang H, Balloux F. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat Commun*. 2018 mcr; 9(1): 1-9.

89. Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, Zhang S, Shen J, Shen Z, Wang Y. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect*. 2018 jul; 7(1): 1-9.

90. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 2009 mai; 25(9): 1189-1191.

91. Wei W, Srinivas S, Lin J, Tang Z, Wang S, Ullah S, Kota VG, Feng Y. Defining ICR-Mo, an intrinsic colistin resistance determinant from *Moraxella osloensis*. *PLoS Genet*. 2018 mai; 14(5): 1-30.

92. Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, Marshall SH, Rudin SD. van Duin D, Kaye K, Jacobs MR, Bonomo RA, Adams MD. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 jan; 59(1): 536-43.

93. Wu C, Wang Y, Shi X, Wang S, Ren H, Shen Z, Wang Y, Lin J, Wang S. Rapid rise of the ESBL and *mcr-1* genes in *Escherichia coli* of chicken origin in China, 2008-2014. Emerging Microbes & Infections. 2018, 7, 30, 10p.

94. Wu R, Yi LX, Yu LF, Wang J, Liu Y, Chen X, Lv L, Yang J, Liu JH. Fitness Advantage of *mcr-1*–bearing IncI2 and IncX4 plasmids in vitro. *Front Microbiol*. 2018 fev; 9(331): 1-9.

95. Yang YQ, Li YX, Lei CW, Zhang AY, Wang HN. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemorther*. 2018 jul; 73(7): 1791-1795.

96. Zankari EA, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012 nov; 67(11): 2640-4.

97. Zhang C, Feng Y, Liu F, Jiang H, Qu Z, Lei M, Wang J, Zhang B, Hu Y, Ding J, Zhu B. A phage-like IncY plasmid carrying the *mcr-1* gene in *Escherichia coli* from a pig farm in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 fev; 61(3): 1-4.

98. Zhang J, Wang J, Chen L, Yassin AK, Kelly P, Butaye P, Li J, Gong J, Cattley R, Qi K, Wang C. Housefly (*Musca domestica*) and blow fly (*Protophomia terraenovae*) as vectors of bacteria carrying colistin resistance genes. *Appl Environ Microbiol*. 2017 dez; 84(1): 1-8.

99. Zhang H, Zhao D, Shi Q, Quan J, Li X, Yu Y. *mcr-1* gene has no effect on colistin resistance when it coexists with inactivated *mgrB* gene in *Klebsiella pneumoniae. Microb Drug Resist*. 2018 out; 24(8): 1117-20.

100. Zeng KJ, Doi Y, Patil Huang X, Tian GB. Emergence of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in colistin-resistant *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemorther*. 2016 mai; 60(6):3862-3.