

JESSICA MOREIRA

**Resistência a colistina: Papel do suíno como reservatório de genes
mcr-1, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* em sistemas de produção intensiva
no Brasil**

São Paulo
2020

JESSICA MOREIRA

Resistência a colistina: Papel do suíno como reservatório de genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* em sistemas de produção intensiva no Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Ass. Andrea Micke Moreno

São Paulo
2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3906
FMVZ

Moreira, Jessica

Resistência a colistina: papel do suíno como reservatório de genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* em sistemas de produção intensiva no Brasil / Jessica Moreira. – 2020.
58 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. Resistência antimicrobiana. 2. Colistina. 3. Suinocultura. 4. Gene *mcr*. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Resistência a Colistina: Papel do suíno como reservatório de genes mcr-1, mcr-2 e mcr-3 em sistemas de produção intensiva no Brasil.", protocolada sob o CEUA nº 5446170717 (ID 004949), sob a responsabilidade de **Andrea Micke Moreno e equipe; Jéssica Moreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 23/05/2018.

We certify that the proposal "Colistin Resistance: Role of swine as reservoir of genes mcr-1, mcr-2 and mcr-3 in intensive production systems in Brazil.", utilizing 750 Swines (males and females), protocol number CEUA 5446170717 (ID 004949), under the responsibility of **Andrea Micke Moreno and team; Jéssica Moreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/23/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [08/2017](#) a [08/2019](#)

Área: [Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Suínos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [65 a 75 dias](#)

N: [750](#)

Linhagem: [Large White](#)

Peso: [25 a 30 kg](#)

Local do experimento: As coletas serão realizadas em cinco diferentes sistemas intensivos de produção de suínos. Nenhum animal será realocado. As amostras serão processadas no Laboratório de Sanidade Suína FMVZ USP.

São Paulo, 20 de maio de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MOREIRA, Jessica

Título: Resistência a colistina: Papel do suíno como reservatório de genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* em sistemas de produção intensiva no Brasil.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família, alicerce da minha vida, que são sempre fundamentais para a construção e realização dos meus sonhos.

À Professora Andrea Micke Moreno pelos ensinamentos, por ter me acolhido e acreditado no meu trabalho e nesse projeto.

À Dra. Tatiana Rodrigues Fraga por ter sido fundamental na minha trajetória, por me inspirar e me fazer ser melhor, tanto profissionalmente quanto pessoalmente.

Aos amigos Carlos, Rosi e Bárbara que tanto me ajudaram e sempre estiveram ao meu lado. Gratidão aos céus pela amizade e por fazerem os meus dias mais felizes.

À Paula, Dona Rose e Alexandre pelos trabalhos técnicos e por serem sempre amáveis.

Aos colegas de laboratório André, Matheus, Vasco, Gabi, Beatriz, Carol, Andressa e Luisa e todos os integrantes e estagiários que passaram pelo laboratório e que colaboraram de alguma forma para a execução desse trabalho.

A todos os meus professores, profissionais que tanto admiro, pela bagagem de conhecimento que construiu e constrói quem sou.

Aos meus grandes amigos de longa data Davi, Danilo, Rafael, Marcos e Verônica por tantos momentos e histórias compartilhadas, obrigada por serem a família que eu escolhi.

À Anne, Luís e Bruno, melhor presente que poderia ter ganho para minha vida. Gratidão pela parceria, pelos momentos incríveis e por me trazerem tanta alegria e felicidade para o meu coração.

À generosidade e amabilidade de todos os seres que cruzaram meu caminho.

“Uma gota de amor é mais que um oceano de intelecto.”

Blaise Pascal

RESUMO

MOREIRA, J. **Resistência a colistina: Papel do suíno como reservatório de genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* em sistemas de produção intensiva no Brasil.** [Colistin Resistance: Role of swine as reservoir of genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* in intensive production systems in Brazil]. 2020. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A distribuição global de genes de resistência à colistina mediada por plasmídeos, como *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* representa uma preocupação para a saúde pública, uma vez que a colistina é utilizada como a última linha de defesa para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes em infecções hospitalares em humanos. Décadas de uso de antimicrobianos na suinocultura intensiva, seja como facilitadores de crescimento, na forma metafilática ou terapêutica, contribuíram com a seleção de estirpes bacterianas resistentes, e o isolamento de enterobactérias resistentes a colistina se tornou muito frequente nesta espécie animal. Considerando a importância da disseminação dos genes de resistência plasmidiais, o presente estudo tem por objetivos avaliar a frequência de animais carregando estirpes de enterobactérias resistentes a colistina e a disseminação dos genes de resistência *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* em 25 sistemas de produção de suínos localizados em diferentes estados do Brasil. Amostras de fezes de suínos foram semeadas em meio seletivo para enterobactérias contendo colistina e as colônias isoladas foram identificadas por espectrometria de massa MALDI-TOF. As estirpes de *Escherichia coli* identificadas foram submetidas à pesquisa dos genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* pela reação em cadeia pela polimerase. A identificação e descrição dos genes relacionados a resistência a colistina em animais de produção no Brasil é de grande importância para conscientização dos produtores e responsáveis cadeia de produção sobre a necessidade de redução no uso deste ativo e para embasar medidas de controle por parte dos órgãos oficiais.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana, colistina, suinocultura, gene *mcr*.

ABSTRACT

MOREIRA, J. **Colistin Resistance: Role of swine as reservoir of genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* in intensive production systems in Brazil.** [Resistência a colistina: Papel do suíno como reservatório de genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* em sistemas de produção intensiva no Brasil]. 2020. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Global distribution of plasmid-mediated colistin resistance genes such as *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* is a public health concern since colistin is used as the last line of defense for the treatment of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria. Decades of antimicrobial usage in swine production used as growth facilitators, prophylactically, metaphylactically or therapeutically contributed to the progressive increase in bacterial resistance, and colistin resistance bacteria are becoming increasingly common. Considering the importance of the dissemination of these genes for public health, the present study aims to evaluate the frequency of animals carrying colistin resistant strains and the dissemination of *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* resistance genes in 25 pig production systems located in the different production areas of Brazil. Feces samples were collected from individual pigs and after streaking the isolated colonies were identified by MALDI-TOF mass spectrometry. The *Escherichia coli* strains were subjected to *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* genes screening by polymerase chain reaction and posteriorly characterization of resistance profile to other antimicrobials. The identification and description of *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* genes in plasmids in Brazil is of great importance in order to evaluate the degree of dissemination of these genes and thus to implement measures to avoid the propagation of this mechanism of resistance.

Key words: Antimicrobial resistance, colistin, swine production, *mcr* gene.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Antimicrobianos	13
2.2 Mecanismos de resistência	14
2.3 Uso de antimicrobianos na suinocultura	15
2.4 Colistina (Polimixina E)	17
2.5 Resistência a colistina.....	20
2.5.1 Gene <i>mcr-1</i>	21
2.5.2 Gene <i>mcr-2</i>	25
2.5.3 Gene <i>mcr-3</i>	27
2.5.4 Gene <i>mcr-4</i>	27
2.5.5 Gene <i>mcr-5</i>	28
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo geral.....	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1. Amostragem.....	31
4.2. Isolamento Bacteriano	33
4.3. Identificação das estirpes por espectrometria de massa MALDI-TOF.....	33
4.4. Extração de DNA	34
4.5. Identificação molecular dos genes <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> , <i>mcr-4</i> e <i>mcr-5</i>	34
5. RESULTADOS.....	36
5.1. Isolamento bacteriano.....	36
5.2. Identificação pela espectrometria de massas MALDI TOF-MS	36
5.3. Detecção dos genes <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> , <i>mcr-4</i> e <i>mcr-5</i>	39
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES.....	46
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são amplamente utilizados na prática veterinária e na produção animal para tratamento, prevenção de doenças e como promotores de crescimento. No entanto, o uso como facilitador de crescimento pode ter contribuído para a seleção e manutenção de bactérias resistentes aos antimicrobianos (LOOFT et al., 2012).

A resistência às diferentes classes de antimicrobianos, utilizados tanto na produção animal quanto em medicina humana, tem sido amplamente descrita e relacionada a um grande número de genes (LIU e POP, 2009); dentre esses antimicrobianos a colistina é de grande relevância por ser um medicamento utilizado como última escolha para tratamento de infecções por bactérias multirresistentes em humanos (CATRY et al., 2015).

Vários mecanismos de resistência à colistina descritos inicialmente eram localizados no cromossomo bacteriano e por isso, lentamente transmitidos, até a identificação do gene de resistência mediado por plasmídeo *mcr-1* em suínos na China (LIU et al., 2016).

A identificação de estirpes de *Escherichia coli* de origem suína carreando o mecanismo de resistência *mcr-1* mediado por plasmídeos no Brasil em 2016 gerou um grande questionamento sobre a real importância e o grau de disseminação deste elemento móvel nos sistemas de produção de suínos nacionais (FERNANDES et al., 2016). Nos últimos anos, novos mecanismos e genes de resistência denominados *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* foram descritos também em plasmídeos identificados na Bélgica, na China, Itália e na Alemanha respectivamente (XAVIER et al., 2016, YIN et al., 2017; CARATOLLI

et al., 2017; BOROWIAK et al., 2017). O isolamento de estirpes de *E. coli* resistentes a altas concentrações de colistina (>8 µg/mL) já havia sido observado em nosso meio, mas estas estirpes não haviam sido caracterizadas quanto a presença de elementos móveis carreando os genes de resistência (MORALES et al., 2012).

Dados epidemiológicos e o amplo uso de colistina na produção animal indicam que a resistência à colistina tem sido transferida de animais para seres humanos (POIREL & NORDMANN, 2016). O Brasil ocupa atualmente o quarto lugar no ranking mundial de produção e exportação de carne suína (MARTINS et al., 2018). Dessa forma, considerando a importância da suinocultura nacional, tornou-se necessário avaliar o grau de disseminação destes elementos móveis nos sistemas de produção de suínos brasileiro e com estas informações oferecer subsídios para os órgãos governamentais regulamentarem o uso deste antimicrobiano em Medicina Veterinária além de informar e esclarecer os produtores e a agroindústria a respeito dos riscos envolvidos neste uso.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Antimicrobianos

Antimicrobianos são substâncias – de origem natural ou sintética, com ação bacteriostática (inibindo o crescimento bacteriano) ou bactericida (causando sua destruição) (EDQVIST, 2001). O primeiro antimicrobiano reconhecido, a penicilina, foi produzido a partir de fungos do gênero *Penicillium*, e foi descoberto por Alexandre Fleming em 1929 sendo utilizado de forma terapêutica a partir de 1941. Após a utilização em medicina humana, os antimicrobianos também passaram a ser utilizados na medicina veterinária – para tratamento das infecções e/ou como facilitadores de crescimento, e também na agricultura (KUMMERER, 2009).

Os antimicrobianos podem ser classificados pelo seu mecanismo de ação ou por sua estrutura química, sendo assim, substâncias de um mesmo grupo se assemelham quanto ao seu mecanismo de ação. Dentre as classes mais conhecidas estão β -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, sulfonamidas e quinolonas (KUMMERER, 2009). Os mecanismos de ação para inibição do crescimento ou destruição dos microrganismos alvo variam, de forma geral os antimicrobianos agem sobre a síntese proteica, sobre a parede celular, sobre a membrana citoplasmática, alterando a síntese dos ácidos nucleicos ou alterando o metabolismo celular (MOREIRA, 2004).

Os antimicrobianos permitiram a cura e o controle de muitas doenças infecciosas, porém uma década após sua descoberta, foi identificada a presença de espécies resistentes à ação dos mesmos. Esses mecanismos de resistência podem ser intrínsecos ao microrganismo ou adquiridos por mutação e transmissão de material genético (MOREIRA, 2004; DŽIDIĆ, 2008).

Fatores como as próprias características bacterianas combinadas com a pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos, além das mudanças sociais e técnicas estão relacionados com o aumento da resistência das bactérias aos antimicrobianos. O uso de forma excessiva e indiscriminada dessas substâncias tem como consequência a seleção de bactérias multirresistentes, o que torna este fenômeno um grave problema de saúde pública uma vez que compromete a eficiência dos antimicrobianos inviabilizando o tratamento das infecções (DŽIDIĆ, 2008; WHO, 2005; LOUREIRO, 2016; FRACAROLLI, 2017; MOTA, 2010; LOW 1998).

2.2 Mecanismos de resistência

Os mecanismos de resistência podem ser intrínsecos – sendo característica natural do microrganismo, que não necessita de exposição prévia ao antimicrobiano para que ocorra (DZIDIC et al., 2008) ou adquiridos – através de mutações gênicas ou transferência horizontal de genes (WOODFORD & ELLINGTON, 2007).

A resistência intrínseca pode ocorrer pela ausência de um processo metabólico influenciável pelo antimicrobiano, pela existência de enzimas capazes de inativar o antimicrobiano ou pelas particularidades da morfologia bacteriana (VEIGA, 1984).

Por sua vez, a resistência adquirida pode ser por mutações espontâneas ou induzidas – além da ação da radiação e agentes alquilantes, também depende de dose ou frequência de utilização de antimicrobianos. As mutações pontuais nos nucleotídeos conferem um fenótipo de resistência aos antimicrobianos (WOODFORD & ELLINGTON, 2007).

2.3 Uso de antimicrobianos na suinocultura

Desde sua descoberta os antimicrobianos têm sido utilizados em medicina veterinária, tanto em animais de companhia quanto em animais de produção, sendo no último caso, usado muitas vezes com o objetivo de aumentar a eficiência de produção de carne e outros produtos de origem animal. A avicultura e suinocultura são, historicamente, as indústrias que mais utilizam antimicrobianos durante o processo de produção (TEUBER, 2001; CROMWEEL, 2002).

O papel dos antimicrobianos como facilitadores de crescimento é discutido por vários autores. Os mecanismos mais frequentemente propostos para elucidar o aumento da produtividade dos animais causados pelo uso de antimicrobianos como facilitadores de crescimento são: a inibição de infecções subclínicas ou processos inflamatórios intestinais, redução da produção de metabólitos bacterianos, redução do uso de nutrientes pela microbiota e aumento da captação de nutrientes devido ao adelgaçamento da parede do intestino. Todas essas propostas têm em comum a premissa de que a população bacteriana intestinal, sejam as bactérias comensais ou patogênicas, tem impacto negativo sobre o crescimento animal, direta ou indiretamente através de suas atividades metabólicas (GASKINS, 2002; VISEK, 1978; ANDERSON, 1999)

A intensificação e a tecnificação de produção de suínos sem dúvida proporcionam melhoria da produtividade e aumento do desempenho animal, porém a concentração de um número elevado de indivíduos em espaços reduzidos facilita a transmissão dos agentes infecciosos, dificulta sua

eliminação do rebanho e sua prevenção através de programas de vacinação. Deste modo, nos últimos 15 anos tornou-se comum o emprego de grandes quantidades de antimicrobianos na forma terapêutica - para tratamento dos animais doentes, profilática – para prevenção de doenças em animais saudáveis e/ou metafilática – cujo objetivo é prevenir a disseminação da doença em animais saudáveis assim que alguns animais adoecem; com o objetivo de reduzir o impacto das doenças bacterianas existentes ou de evitar sua manifestação clínica no rebanho (EDQVIST, 2001; RHOUMA et al., 2016(a); DIAS et al., 2011).

Porém, atualmente há uma pressão para que haja proibição na utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento. No Brasil, desde 2010 já constava no Relatório Técnico do Grupo de Trabalho Portaria 428/2009, de 09 de agosto de 2010 a possibilidade de transferência de determinantes genéticos de resistência entre as bactérias, mas somente em 2016, após a descoberta do gene *mcr-1* a fabricação e importação de sulfato de colistina com a finalidade de produção de aditivos alimentares e melhorador zootécnico foi proibida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (IN nº 45 de 22 de Novembro de 2016). O uso terapêutico do princípio ativo ainda é permitido.

2.4 Colistina (Polimixina E)

A Colistina (também denominada polimixina E) é um antibiótico da família das polimixinas, sintetizado por *Paenibacillus polymyxa* subsp. *colistinus* e apresenta ação bactericida sobre agentes Gram-negativos. A propriedade antibiótica das polimixinas foi descoberta na década de 1940 e da colistina por volta de 1950, porém este ativo teve seu uso muito reduzido na década 1970 devido a altas taxas de nefrotoxicidade e neurotoxicidade. No entanto, na década de 1990 as polimixinas foram reintroduzidas na prática clínica como antimicrobianos de última escolha no combate de infecções por bactérias Gram negativas multiresistentes em ambientes hospitalares (TAMBADOU et al., 2015; AINSWORTH et al., 1947; YU et al., 2015).

As polimixinas são detergentes de polipeptídeos cíclicos com uma cadeia lateral de tripeptídeos ligados a um terminal de ácidos graxos, seu peso molecular é de 1750 Daltons (YU et al., 2015; STORM et al., 1977). Das polimixinas descritas (A, B, C, D e E), somente polimixina E - também chamada de colistina e polimixina B estão disponíveis para o uso clínico, ambas compartilham uma sequência primária comum, sendo distintas em um único aminoácido na posição 6 (D-fenilalanina na polimixina B e D-leucina na colistina - Figura 1) (ZAVASCKI et al., 2007 (b); LANDMAN et al., 2008).

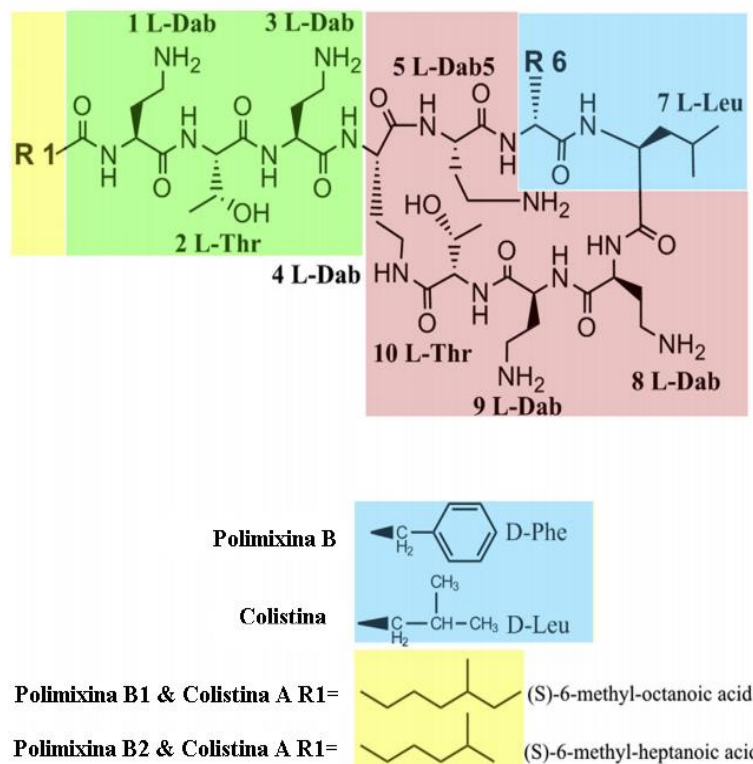


Figura 1. Estruturas químicas da polimixina B e colistina. Os segmentos funcionais das polimixinas são coloridos como se segue: amarelo, cadeia de ácido graxo; verde, segmento tripeptídico linear; vermelho, os resíduos polares do heptapeptídeo; azul, região hidrofóbica dentro do anel heptapeptídico. Thr: treonina; Phe: fenilalanina; Leu: leucina; Dab: ácido diaminobutírico. (Adaptado de KAYE et al, 2016 e YU et al, 2015).

O alvo da ação antimicrobiana da colistina é o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa, que é composto por três regiões: internamente o lipídeo A, no centro uma região oligossacarídica e uma cadeia externa do antígeno O. O lipídeo A serve de âncora hidrofóbica sendo de extrema importância, pois estabiliza a membrana externa bacteriana e auxilia na inserção da colistina na membrana da bactéria, já o Ca^{2+} e o Mg^{2+} atuam como as moléculas adjacentes de LPS. A associação da colistina com a membrana externa ocorre através de interações eletrostáticas entre o polipeptídeo catiônico (colistina) e moléculas ânionicas do LPS das bactérias Gram-negativas, resultando no deslocamento de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}), levando ao desarranjo da membrana celular. Isso permite que a colistina insira sua cadeia hidrofóbica de

ácido graxo e o aminoácido D-Leu na membrana externa para interagir com os ácidos graxos do lipídeo A, desestabilizando a membrana e permitindo a passagem da colistina, que no espaço periplasmático rompe a membrana interna levando a lise e a morte celular (NEWTON et al., 1956; YU et al., 2015).

Sulfato de colistina é a única forma comercialmente disponível aprovada para uso na produção animal em alguns países, sendo predominantemente administrada pela via oral para o controle de infecções intestinais causadas por enterobactérias, especialmente *Escherichia coli* (RHOUMA et al., 2016(b); EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2016).

O uso metafilático oral é o mais comum em todo o mundo, envolvendo o tratamento de todos os animais expostos ao agente infeccioso, tanto os doentes como os clinicamente saudáveis (CASAL et al., 2007). Contudo, em 2016 a Agência Europeia de Medicamentos limitou a indicação da colistina apenas para o tratamento de infecções intestinais, proibindo o uso profilático da mesma (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2016).

2.5 Resistência a colistina

O mecanismo mais comum de resistência a colistina em *Escherichia coli* envolve a modificação do LPS na porção do lipídeo A devido à alteração da atração eletrostática por meio da redução da carga negativa da membrana externa, reduzindo assim a interação do ativo com a célula bacteriana. Este mecanismo cromossomal é o resultado da blindagem dos fosfatos no lípideo A, por meio de fosfoetanolamina (pEtN) e L-4-aminoarabinose (L-Ara4N) os quais são carregados positivamente, mediados pela ativação dos sistemas de dois componentes PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB que ocorre por mutações específicas ou estímulos ambientais que conduzem a uma sobre expressão de genes LPS-modificados (Figura 2) (BERGEN et al., 2012.; OLAITAN et al., 2014).

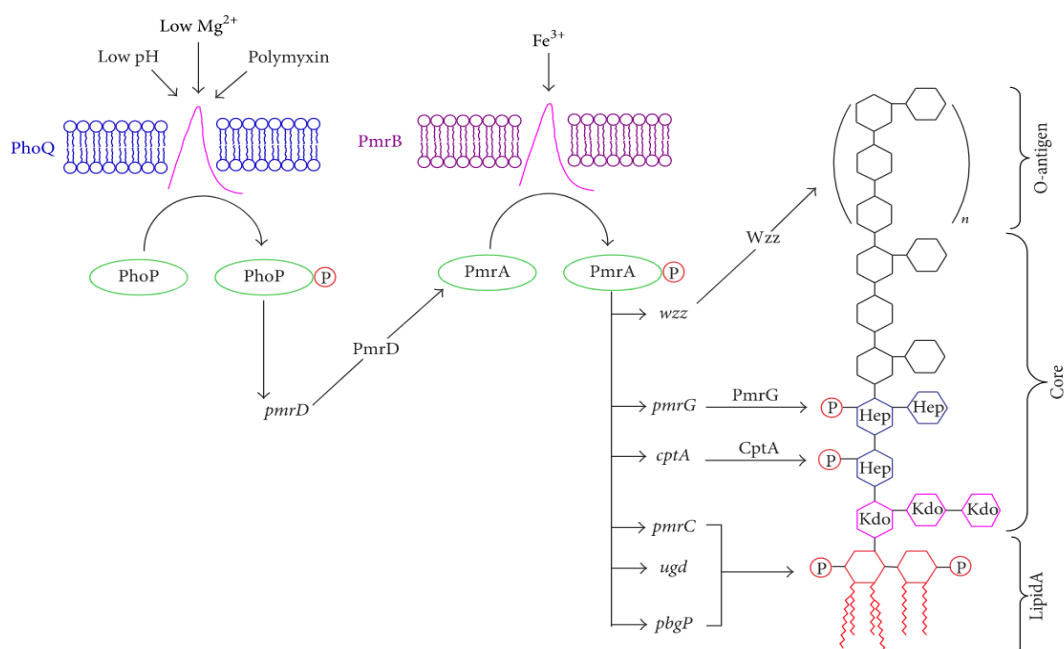


Figura 2. Ativação de genes modificadores de lipopolissacáridos envolvidos na resistência à polimixina em bactérias Gram-negativas (YU et al., 2015).

Recentemente novos genes de resistência mediados por plasmídeos (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*) que conferem resistência a colistina foram identificados em isolados bacterianos de animais de diferentes espécies, humanos e alimentos em diversas partes do mundo (LIU et al., 2016; XAVIER et al., 2016, YIN et al., 2017, CARATTOLI et al., 2017; BOROWIAK et al., 2017).

A descoberta de um mecanismo transmissível, não cromossômico de resistência representa grande preocupação sobre a possibilidade da perda da eficácia da colistina para o tratamento das infecções em seres humanos e sobre a propagação da resistência à colistina na produção animal, especialmente em suínos e aves (RHOUMA et al., 2016(b)).

2.5.1 Gene *mcr-1*

O gene *mcr-1* faz parte da família de enzimas fosfoetanolamina (pEtN) transferase, que modificam o lipídeo A - reduzindo a carga negativa e evitando assim a ligação da colistina, conferindo resistência (LIU et al., 2016; HU et al., 2016). Estudos dos mecanismos estruturais e funcionais demonstram que essa atividade enzimática do *mcr-1* atribui a resistência das células bacterianas à colistina (MA et al., 2016; SUN et al., 2017; GAO et al., 2016; STOJANOSKI et al., 2016; HU et al., 2016; XU et al., 2018).

Há evidências de que o gene *mcr-1* exista desde a década de 1980 - quando a colistina começou a ser utilizada em animais de produção na China, mas apenas no final de 2015 foi descrito e desde então foi identificado a partir de isolados bacterianos de animais e seres humanos em diversos países como Brasil, Laos, Tailândia, China, EUA, Portugal, Espanha, França, Holanda,

Alemanha, Itália, Suíça (SHEN et al., 2016; ROCHA et al., 2017; CONCEIÇÃO-NETO et al., 2017; OLAITAN et al., 2016; SANCHEZ-BENITO et al., 2017; BARON et al., 2017; TERVEER et al., 2017; ROSCHANSKI et al., 2017; CORBELLA et al., 2017; LIASSINE et al., 2016).

A maior taxa de genes de resistência à colistina *mcr-1* foi detectada em animais, especialmente em países com alto consumo de colistina na agricultura. Portanto a pecuária foi determinada como o principal reservatório do gene *mcr-1* devido à elevada taxa de isolados portadores desse mecanismo de resistência em comparação com os seres humanos e também pelo alto consumo de colistina na medicina veterinária (Figura 3) (NORDMANN et al., 2016; RHOUMA et al, 2016(b); FERNANDES et al., 2016; POIREL et al., 2016).

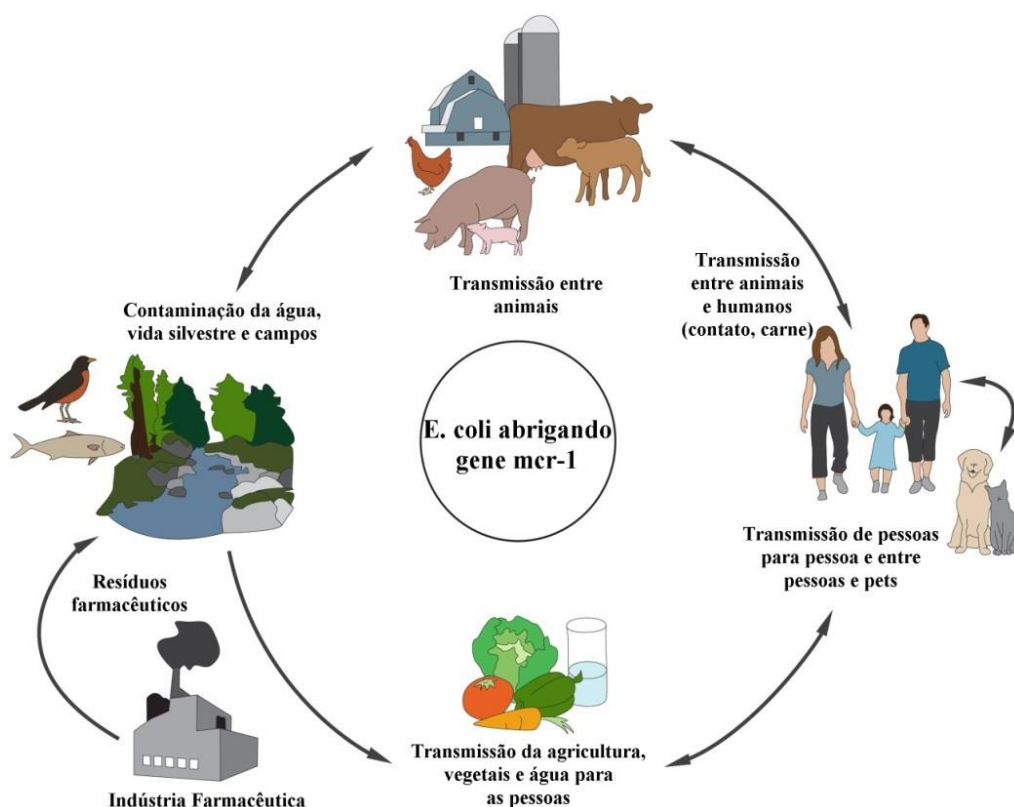


Figura 3 - Circulação de *Escherichia coli* resistente à colistina contendo o gene *mcr-1* entre animais-ambiente-alimento e humanos (adaptado de RHOUMA et al., 2016 (b)).

A quantidade e variedade de genes de resistência à colistina identificados e como se dá essa distribuição geográfica desses plasmídeos tem sido foco de estudos epidemiológicos contribuindo assim, com a conscientização e importância da implantação de medidas para evitar a propagação deste mecanismo de resistência (MORALES et al., 2012; LIU et al., 2018).

Após a identificação do gene *mcr-1*, variantes do mesmo foram descritas em diversas partes do mundo, incluindo *mcr-1.2* em *Klebsiella pneumoniae* isolada de um swab retal de uma criança com leucemia na Itália (KX236309), *mcr-1.3* em *Escherichia coli* de frangos da China (KU934208), *mcr-1.4* em *Escherichia coli* de esgoto na China (KY041856), *mcr-1.5* em *Escherichia coli* isolada de um trato urinário humano na Argentina (KY283125), *mcr-1.6* em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium de humano saudável na China (KY352406), *mcr-1.7* em *Escherichia coli* de esgoto na China (KY488488), *mcr-1.8* em *Escherichia coli* de aves domésticas em Brunei (KY683842), *mcr-1.9* em *Escherichia coli* de suínos em Portugal (KY780959), *mcr-1.10* em *Moraxella sp.* de suínos nos Estados Unidos da América (MF176238), *mcr-1.11* em *Escherichia coli* de suínos no Reino Unido (MG198057), *mcr-1.12* em *Escherichia coli* de suínos no Japão (LC337668), *mcr-1.13* em *Escherichia coli* de carne de peru na Alemanha (MG384739) e *mcr-1.14* em *Escherichia coli* de suínos no Reino Unido (LS398440).

Estas variantes gênicas codificam enzimas da fosfoetanolamina transferase, e diferem do *mcr-1* em um único aminoácido, porém não se sabe

qual é a consequência dessas substituições sobre a função dessas variantes (ZHAO et al., 2017).

Além da identificação do gene *mcr-1* e suas variantes em diferentes países nos cinco dos sete continentes (China, Camboja, Japão, Laos, Malásia, Taiwan, Tailândia, Vietnã, Bélgica, Dinamarca, França, Alemanha, Grã-Bretanha, Itália, Lituânia, Polônia, Portugal, Espanha, Suíça, Argélia, Egito, Nigéria, África do Sul, Tunísia, Argentina, Brasil, Canadá e EUA (Figura 4), novas variantes emergentes do gene de resistência a colistina foram descritos, dos quais, *mcr-2* foi descrito em *Escherichia coli* de suínos e bovinos na Bélgica em 2016, *mcr-3* descrito em isolados de *Escherichia coli* de suínos em 2017 na China, *mcr-4* descrito em *Salmonella* e *Escherichia colina* na Itália, Espanha e Bélgica durante o período de 2013-2016 e o gene *mcr-5* em isolados de *Salmonella enterica* de aves e alimentos em 2017 na Alemanha (AL-TAWFIQ et al., 2017; SCHWART et al., 2016; WANG et al., 2017; XAVIER et al., 2016; YIN et al., 2017; CARATTOLI et al., 2017; BOROWIAK et al., 2017).

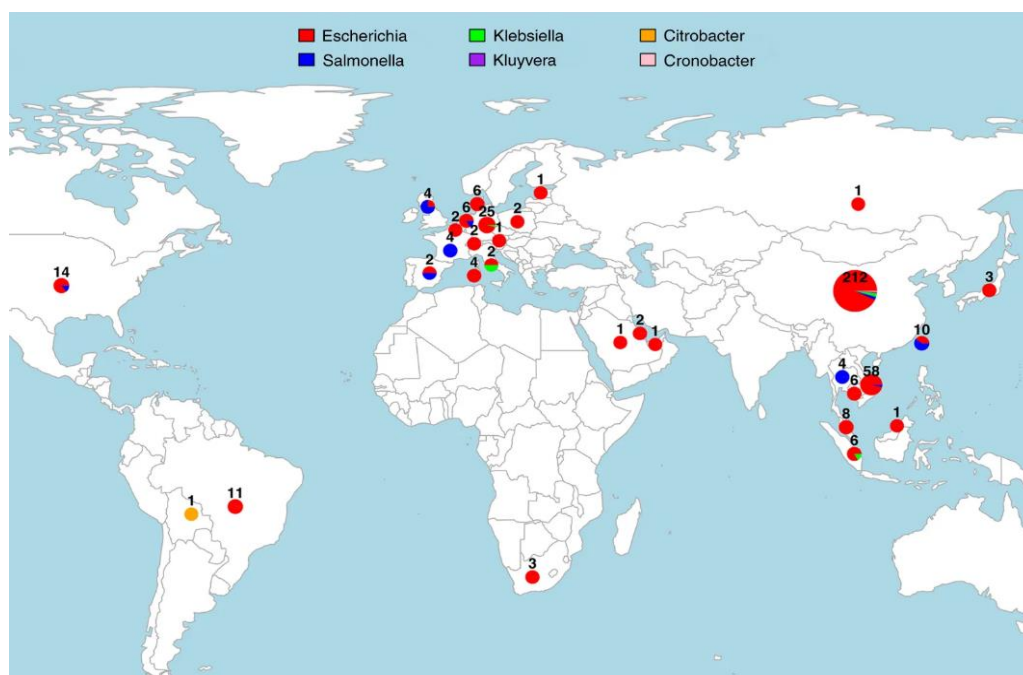


Figura 4 - Mapa global de isolados positivos para *mcr-1* – as diferentes cores indicam o gênero bacteriano, o número e tamanho dos discos indicam o tamanho da amostragem por localização (WANG 2018).

2.5.2 Gene *mcr-2*

O gene *mcr-2*, com 1,617 pb, compartilha a identidade de 76,7% com o gene *mcr-1* (Figura 5). Foi descrito em amostras de *Escherichia coli* resistentes a colistina originadas de amostras de suínos e bovinos que não continham o gene *mcr-1* em 2016 na Bélgica (XAVIER et al., 2016).

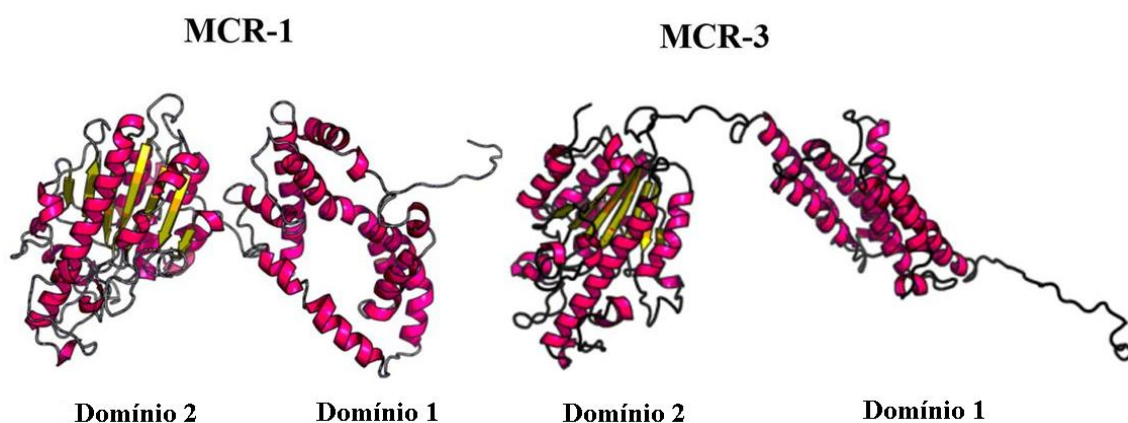


Figura 5- Estruturas dos dois domínios de MCR-2 e MCR-1, sendo o domínio 1 foi referido como transportador e o domínio 2 como fosfoetanolamina transferase (sulfatase) (XAVIER et al., 2016).

Apesar de ocorrer em frequência menor do que o *mcr-1*, o gene *mcr-2* já foi encontrado em bactérias Gram-negativas resistentes a colistina originadas de suínos e de alimentos (ABUOUN et al., 2017; GARCIA-GRAELLS et al., 2018; et al., 2017; WANG et al., 2018).

Porém, não houve a ocorrência do determinante de resistência a colistina *mcr-2* nos isolados resistentes na França, Holanda, Alemanha, Suíça, China e Japão (XAVIER et al., 2016; SALY et al., 2017; TERVEER et al., 2017; ROSCHANSKI et al., 2017; ZURFLUH et al., 2017; BUSS et al., 2017; SUN et al., 2017; KAWANISHI et al., 2017). Esses registros apontam que o gene *mcr-2* não está globalmente disseminado.

Um estudo filogenético sugeriu que para a aquisição de resistência à colistina os genes *mcr-1* e *mcr-2* podem compartilhar uma história evolutiva semelhante (Figura 6), o subclado I foi apresentado com o *mcr-2* (e/ou *mcr-1*) transportado pelo plasmídeo e com a *Paenibacillus* PEA transferase codificada cromossomicamente. Em contraste, o subclado II foi associado à *Neisseria* com o gene *LptA* – relacionado a resistência aos peptídeos antimicrobianos catiônicos - também codificado cromossomicamente. Porém essa evidência experimental não é suficiente para nos indicar o ancestral da proteína *mcr-2* (SUN et al., 2017). Outro estudo indica um provável mecanismo catalítico idêntico já que existem regiões já determinadas como essenciais ou importantes para *mcr-1* que são conservadas em *mcr-2* (COATES et al., 2017).

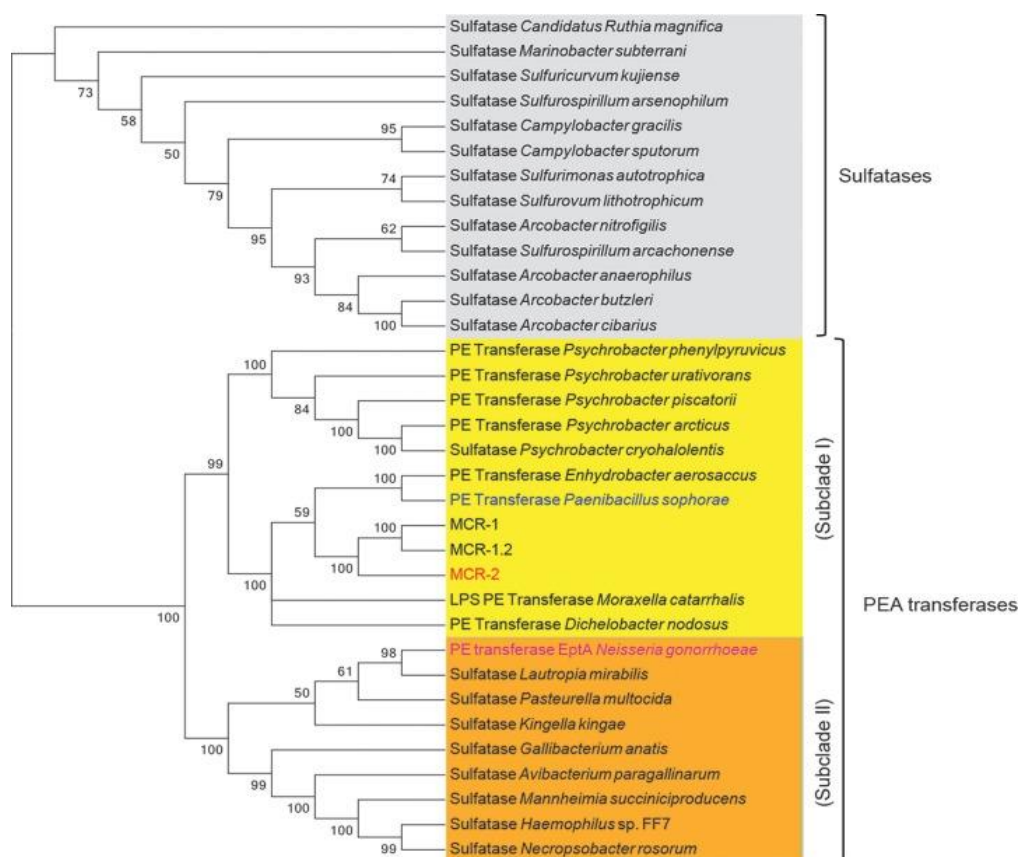


Figura 6 - Filogenia do *mcr-2* e seus homólogos. A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança baseado no modelo de 2008 de Le e Gascuel (SUN et al., 2018). Árvore filogenética dispõe de dois grupos: sulfatases (em cinza) e fosfoetanolamina transferases (PEA transferases) - este último consiste em dois subclados: subclado I (amarelo), incluindo MCR-2 (vermelho) e PEA transferase de *Paenibacillus sophorae* (azul) e subclado II (laranja) com *Neisseria gonorrhoeae* *LptA* (rosa) (YIN et al., 2017).

2.5.3 Gene *mcr-3*

O gene de resistência móvel *mcr-3* foi descrito primeiramente em isolados de *Escherichia coli* de suínos, apresenta identidade de 45,0% e 47,0% na sequência de nucleotídeos com *mcr-1* e *mcr-2*, respectivamente (YIN et al., 2017). Outras variantes foram descritas em amostras de *Shigella sonnei* de swab retal de humano na Tailândia, de *Klebsiella pneumoniae* isolada de pus na Tailândia, de *Escherichia coli* de amostra de secreção humana na China, de *Escherichia coli* isolada de cloaca de pato na China e amostra 3.11 sem identificação do tipo de amostra isolada de *Escherichia coli* também na China (Genbank: KY924928, NPZH01000177, FLXA01000011, MF463699, MG214533 e MG489958 respectivamente) (ALBA et al., 2018).

A prevalência do *mcr-3* é menor somente em relação ao gene *mcr-1* já foi descrito na China, Japão, Singapura, Malásia, Tailândia, Dinamarca, França, Espanha, Estados Unidos da América e no Brasil (BI et al., 2017; LIU et al., 2017; TEO et al., 2018; FUKUDA et al., 2018; LITRUP et al., 2017; ROER et al., 2017; HAENNI et al., 2018; HERNÁNDEZ et al., 2017; XU et al., 2018; KIEFFER et al., 2018).

2.5.4 Gene *mcr-4*

Ao contrário do *mcr-1* que é predominantemente distribuído no mundo inteiro, o gene de resistência à colistina *mcr-4*, foi identificado apenas na Itália, Espanha, Bélgica e China em isolados de origem suína (CHEN et al., 2018; BOROWIAK et al., 2017).

As variantes de *mcr-4* descritas até o momento são *mcr-4.1* isolado de *Salmonella enterica* de suínos na Itália, *mcr-4.2* isolada de *Salmonella enterica*

de fezes humanas na Itália em 2016 (MG581979) e mcr-4.3 posteriormente classificada como mcr-4.6 isoladas de *Salmonella enterica* de suínos na Espanha em 2018 (MH423812) (ALBA et al., 2018; REBELO et al., 2018). Recentemente foi descrito o isolado de *Acinetobacter baumannii* carreando gene mcr-4 em paciente com meningite no Brasil (MARTINS-SORENSEN et al., 2019).

2.5.5 Gene *mcr-5*

O gene de resistência mcr-5 (1644 pb) foi identificado em *Salmonella Paratyphi* de aves domésticas e carne de frango no período de 2011 a 2013 e pode ser dividido em três domínios: um domínio transmembrana, um domínio de função desconhecida (DUF1705) e um domínio de sulfatase, que também são observados para mcr-1, mcr-2, mcr-3 e mcr-4. Porém, o mcr-5 é distinto de mcr-1, mcr-2, mcr-3 e mcr-4 com identidade de sequência proteica de 36,11%, 35,29% 34,72% e 33,71%, respectivamente. Contudo, resíduos idênticos em mcr-1, mcr-2, mcr-3 e mcr-4 encontrados no domínio de sulfatase podem ser alinhados ao mcr-5, esses resíduos foram considerados críticos para ligação do substrato e à resistência a colistina mediada por mcr-1 (BOROWIAK et al., 2017).

Além dos cinco genes presentes nesse trabalho, já foram descritos as variantes mcr-6 contendo 1617 pb – anteriormente nomeado como mcr-2.2 - isolado de *Moraxella pluranimalium* de suínos na Grã-Bretanha entre 2014 e 2015, mcr-7.1 contendo 1620 bp isolado de *Klebsiella pneumoniae* de aves comerciais na China, mcr-8 isolado de *Klebsiella pneumoniae* de amostras de fezes de suínos na China e mcr-9 isolado de *Salmonella enterica* sorotipo

Typhimurium de paciente humano nos Estados Unidos da América em 2019 (YANG et al., 2018; WANG et al., 2018; ABUOUN et al., 2017; CARROL et al., 2019).

A detecção de novos homólogos do gene *mcr* sugere que a transferência dos mecanismos cromossomais mediadores de resistência a colistina para elementos móveis pode ter ocorrido em eventos independentes, levantando questionamentos sobre a real variedade de genes móveis resistentes a colistina e sua prevalência (BOROWIAK et al., 2017).

A investigação da frequência das novas variantes do gene *mcr* nos sistemas de produção suína nacional é importante para a compreensão e introdução da vigilância no Brasil e em todo o mundo, uma vez que estes novos genes podem ser rapidamente disseminados, e assim representar uma ameaça para a saúde pública (SUN et al., 2017). A determinação da frequência desse mecanismo de resistência no Brasil nos traz informações para que o tema seja discutido dentro do contexto de Saúde Única.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a frequência de animais carreando estirpes de enterobactérias resistentes a colistina e a disseminação dos genes de resistência *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* em estirpes de *Escherichia coli* de 25 sistemas de produção de suínos localizados em diferentes estados do Brasil.

3.2. Objetivos específicos

1. Isolar estirpes de enterobactérias resistentes a colistina em suínos provenientes de sistemas intensivos de produção;
2. Identificar as estirpes bacterianas isoladas pela técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF;
3. Pesquisar a ocorrência de genes de resistência plasmidiais *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* nas estirpes de *Escherichia coli* isoladas;
4. Confrontar os dados obtidos sobre a presença de genes *mcr* com a literatura para compreender a situação do Brasil acerca da resistência a colistina em sistema de produção de suínos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostragem

Foram avaliadas 750 amostras de fezes coletadas em 25 granjas de suínos de diferentes estados do Brasil (Quadro 1). As amostras foram coletadas de suínos com idade variando entre 65 e 75 dias, sendo coletados 30 animais em cada granja. As granjas foram avaliadas quanto a utilização ou não de colistina, e foram classificadas de acordo com a quantidade e com o uso de antimicrobianos nas diferentes fases de produção (Quadro 2). As amostras foram mantidas sob refrigeração (4°C) até a chegada ao laboratório de Sanidade Suína da FMVZ/USP para o processamento.

Quadro 1 – Distribuição das granjas avaliadas de acordo com o Estado de origem.

Estados	Número de granjas
MG	6
PR	5
SP	4
RS	3
DF	2
SC	2
ES	1
GO	1
MT	1
Total	25

Quadro 2 – Características das 25 granjas avaliadas de acordo com o nível de utilização de antimicrobianos (Fonte: Dutra 2017).

N. Granja	Estado	Tamanho rebanho fêmeas	% Vida Exposto a antimicrobianos	mg Atb / Kg	Uso de colistina/ Fase*
1	DF	3500	90,4	344,3	Sim/ Creche
2	PR	3500	73,7	532,3	Sim/ Creche
3	MG	1000	46,1	322,3	Sim/ Creche
4	MT	15000	86,9	345,1	Não
5	RS	600	59,5	292,5	Não
6	GO	560	53,3	330,3	Não
7	SC	2200	81,8	236,7	Não
8	ES	480	85,6	521,4	Não
9	SP	150	86,0	531,4	Sim/ Term.
10	MG	5200	84,0	372,1	Sim/ Creche e term.
11	SP	540	84,4	573,4	Sim/ Creche
12	SP	900	5,0	5,4	Não
13	DF	8000	82,1	283,5	Sim/ Creche
14	RS	300	2,9	27,6	Não
15	SC	1700	69,2	388,5	Sim/ Creche
16	MG	500	60,0	247,2	Não
17	MG	800	68,8	344,8	Não
18	PR	1550	85,9	502,7	Sim/ Creche
19	SP	3500	87,5	488,3	Sim/ Creche
20	RS	600	53,7	423,4	Não
21	MG	1000	54,2	332,1	Sim/ Creche
22	PR	480	55,3	370,2	Sim/ Creche
23	PR	2350	83,7	345,8	Não
24	PR	5500	30,5	212,9	Não
25	MG	1480	87,7	585,6	Sim/ Creche e Term.

*Term: Terminação

4.2. Isolamento Bacteriano

As amostras de fezes foram semeadas em ágar MacConkey (Difco-BBL, Detroit, MI /USA) contendo 2 µg/mL de sulfato de colistina. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em aerobiose. As colônias bacterianas isoladas foram semeadas em 3 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion- Difco) e a partir deste cultivo foi separada uma alíquota para estoque a -86° C e outra foi submetida à identificação pela espectrometria de massa MALDI-TOF (Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight).

4.3. Identificação das estirpes por espectrometria de massa MALDI-TOF

Uma alíquota de 1 mL do cultivo bacteriano foi centrifugada a 5.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado; o pélete recebeu 300 µl de água ultrapura e 900 µl de etanol, foi agitado e em seguida os tubos foram centrifugados a 13.000xg por 2 minutos. Após descarte do sobrenadante, os sedimentos foram secos em temperatura ambiente. Aos sedimentos, foram adicionados 50 µl de ácido fórmico (70%), e 50 µl de acetonitrila (100%). A mistura foi novamente centrifugada a 13.000xg por 2 minutos e o sobrenadante foi transferido à um microtubo novo e armazenado a -20°C.

Para leitura pelo MALDI-TOF MS foi utilizado o espectrofotômetro de massa Microflex™ (Bruker Daltonik) da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, com o auxílio técnico da Dra. Maria Inês Zanoli Sato e sua equipe. Para leitura, 1 uL de suspensão proteica foi transferido para a placa de aço inox de 96 poços. Após secagem em temperatura ambiente, foi adicionado sobre a amostra 1 uL da matrix (ácido α-ciano-4-hidróxido-cinamico). Cada estirpe foi distribuída em três poços (triplicata) e para cada placa foram

realizadas duas leituras, totalizando a captura de seis espectros proteicos por estirpe. Para captura dos espectros proteicos foi utilizado o programa FlexControl™ (Bruker Daltonik) pelo método MTB_autoX. O espectrofotômetro foi externamente calibrado através da utilização de proteínas ribossômicas de *Escherichia coli* (BTS - Bruker Daltonik).

Para a identificação bacteriana pelo espectro proteico foi utilizado o programa BioTyper™ (MALDI Biotyper CA Systems) 3.0 (Bruker Daltonik) 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, obtém-se um valor de escore (*log (score) value*). Os critérios para interpretação dos padrões da fabricante Bruker Daltonik 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.

4.4. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Boom et al. (1990). As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até o momento das análises.

4.5. Identificação molecular dos genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*

As estirpes foram submetidas a pesquisa dos genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*. Para a detecção dos genes a reação foi realizada utilizando-se 5 μl do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl_2 , 10 pmoles de cada *primer* (Quadro 3), 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão de PCR, 200mM de

cada dNTP e água até o volume final de 50 µl. Os parâmetros das reações foram ajustados segundo o descrito por LESCAT et al. (2018).

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 2,5%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA). Os fragmentos foram visualizados em sistema de fotodocumentação *Gel Doc XR System* (Bio-Rad Laboratories), e os mesmos foram corados com o corante *BlueGreen*[®] (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA *Ladder* (New England BioLabs).

Quadro 3- Oligonucleotídeos utilizados na PCR para detecção dos genes mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 e mcr-5 (LESCAT et al., 2018).

Gene	Nome primer	Sequência (5'-3')	Produto (pb)
mcr-1	mcr1-mtpF	ATGCCAGTTTCTTTTCGCGTG	502
	mcr1-mtpR	TCGGCAAATTGCGCTTTTGGC	
mcr-2	mcr2-mtpF	GATGGCGGTCTATCCTGTAT	379
	mcr2-mtpR	AAGGCTGACACCCCATGTCAT	
mcr-3	mcr3-mtpF	ACCAGTAAATCTGGTGGCGT	296
	mcr3-mtpR	AGGACAACCTCGTCATAGCA	
mcr-4	mcr4-mtpF	TTGCAGACGCCCATGGAATA	207
	mcr4-mtpR	GCCGCATGAGCTAGTATCGT	
mcr-5	mcr5-mtpF	GGACGCGACTCCCTAACTTC	608
	mcr5-mtpR	ACAACCAGTACGAGAGCACG	

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento bacteriano

A partir das 750 amostras de fezes coletadas em 25 sistemas de produção de suínos em nove estados diferentes do Brasil, foi isolado um total de 1589 estirpes, considerando as diferentes características morfológicas de crescimento na placa com presença de sulfato de colistina.

5.2. Identificação pela espectrometria de massas MALDI TOF-MS

Um total de 9 gêneros e 15 espécies bacterianas foram identificadas por espectrometria de massa MALDI-TOF. As estirpes identificadas foram principalmente de *Escherichia coli*, representando cerca de 65% do total (Tabela 1). Em relação às granjas, a granja 7 foi a que apresentou maior número de isolados de diferentes gêneros e maior número de isolados de *Escherichia coli* (Tabela 2).

Tabela 1 – Frequência das estirpes resistentes a colistina isoladas identificadas por MALDI TOF-MS.

<i>Estirpes isoladas</i>	Nº Isolados	Porcentagem (%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0,06%
<i>Citrobacter braakii</i>	1	0,06%
<i>Escherichia coli</i>	1040	65,45%
<i>Escherichia fergusonii</i>	1	0,06%
<i>Morganella morganii</i>	76	4,78%
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	45	2,83%
<i>Proteus mirabilis</i>	26	1,64%
<i>Proteus penneri</i>	162	10,20%
<i>Proteus stuartii</i>	20	1,26%
<i>Proteus vulgaris</i>	25	1,57%
<i>Providencia alcalifaciens</i>	40	2,52%
<i>Providencia rettgeri</i>	87	5,48%
<i>Providencia stuartii</i>	61	3,84%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0,13%
<i>Ralstonia pickettii</i>	2	0,13%
TOTAL	1589	100,00%

Tabela 2 – Distribuição das estirpes bacterianas resistentes a colistina isoladas por granja.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7*	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	G19	G20	G21	G22	G23	G24	G25	TOTAL
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Citrobacter braakii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Escherichia coli</i>	57	53	25	41	44	39	63	43	36	36	33	55	58	44	43	57	43	40	31	61	8	9	24	36	61	1040
<i>Escherichia fergusonii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Morganella morganii</i>	0	1	10	4	9	14	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	8	1	2	4	4	0	0	76
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	0	0	0	1	0	0	2	6	7	1	7	0	0	1	5	3	3	0	0	0	0	9	0	0	0	45
<i>Proteus mirabilis</i>	8	8	2	1	4	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
<i>Proteus penneri</i>	0	0	0	0	1	0	8	3	13	16	5	1	0	26	0	0	0	2	10	3	15	0	16	28	15	162
<i>Proteus stuartii</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1	0	0	9	6	0	0	20
<i>Proteus vulgaris</i>	2	0	2	0	4	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	8	1	0	25
<i>Providencia alcalifaciens</i>	3	1	7	0	0	2	6	0	1	1	2	0	0	1	9	0	0	1	0	0	5	1	0	0	0	40
<i>Providencia rettgeri</i>	0	2	13	0	17	10	1	1	0	4	2	0	0	0	0	0	0	4	0	0	15	3	7	7	1	87
<i>Providencia stuartii</i>	0	0	0	0	0	0	14	0	4	0	2	0	2	0	18	0	0	2	4	0	8	7	0	0	0	61
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Ralstonia pickettii</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
TOTAL	70	65	59	47	79	69	96	59	61	58	51	57	60	74	77	61	47	65	54	66	53	47	65	72	77	1589

*Granja 7 que apresentou maior número de isolados, maior diversidade de espécies identificadas e maior número de estirpes de *E. coli* resistentes a colistina

5.3. Detecção dos genes mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 e mcr-5

Para a identificação dos genes mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 e mcr-5 foram selecionadas as estirpes de *Escherichia coli* das 25 granjas. Destas, 1040 estirpes (94,4%) foram positivas para o gene mcr-1, nenhuma das estirpes foi positiva para o mcr-2, 13 (1,25%) foram positivas para o mcr-3, 24 (2,3%) foram positivas para mcr-4 e 3 (0,2%) estirpes de *Escherichia coli* foram positivas para mcr-5 (Tabela 3).

Todas as granjas foram positivas para o gene mcr-1 em mais de 88% das estirpes (variando de 88 a 100% das estirpes), exceto a granja 4 que apresentou 9,8% de positividade nas estirpes avaliadas. O gene mcr-3 esteve presente na granja 1 em 3,5% das estirpes, na granja 12 em 14,5% das estirpes e na granja 16 em 5,2% das estirpes.

As granjas 7, 12, 13, 14 e 16 foram positivas para o gene mcr-4 em 22,2%, 5,4%, 6,8%, 2,2% e 3,5% das estirpes respectivamente e o gene mcr-5 foi encontrado apenas na granja 7 em 4,7% das estirpes.

No entanto, não houve relação entre a quantidade de antimicrobianos utilizados em cada granja com a quantidade de genes de resistência identificados nas mesmas. A granja 7, por exemplo, apesar de não utilizar a maior quantidade de antimicrobianos, nem utilizar colistina em nenhuma das fases da produção no momento da colheita, apresentou o maior número de isolados resistentes e três dos cinco genes pesquisados.

Tabela 3 – Frequência de estirpes de *E. coli* positivas para os genes de resistência a colistina mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 e mcr-5 distribuídos de acordo com as granjas de origem.

Granja	Nº de estirpes	<i>mcr-1</i>	<i>mcr-2</i>	<i>mcr-3</i>	<i>mcr-4</i>	<i>mcr-5</i>
1	57	56 (98%)	0	2 (3,5%)	0	0
2	40	40 (100%)	0	0	0	0
3	25	25 (100%)	0	0	0	0
4	41	4 (9,8%)	0	0	0	0
5	44	44 (100%)	0	0	0	0
6	39	39 (100%)	0	0	0	0
7	63	60 (95,2%)	0	0	14 (22,2%)	3 (4,7%)
8	43	43 (100%)	0	0	0	0
9	36	36 (100%)	0	0	0	0
10	36	33 (91,6%)	0	0	0	0
11	33	32 (96,9%)	0	0	0	0
12	55	55 (100%)	0	8 (14,5%)	3 (5,4%)	0
13	58	57 (98,2%)	0	0	4 (6,8%)	0
14	44	40 (90,9%)	0	0	1 (2,2%)	0
15	43	43 (100%)	0	0	0	0
16	57	56 (98,2%)	0	3 (5,2%)	2 (3,5%)	0
17	43	39 (90,6%)	0	0	0	0
18	40	40 (100%)	0	0	0	0
19	31	30 (96,7%)	0	0	0	0
20	61	60 (98,3%)	0	0	0	0
21	8	8 (100%)	0	0	0	0
22	9	8 (88,8%)	0	0	0	0
23	24	24 (100%)	0	0	0	0
24	49	49 (100%)	0	0	0	0
25	61	61 (100%)	0	0	0	0
Total	1040	982 (94,4%)	0	13 (1,25%)	24 (2,3%)	3 (0,2%)

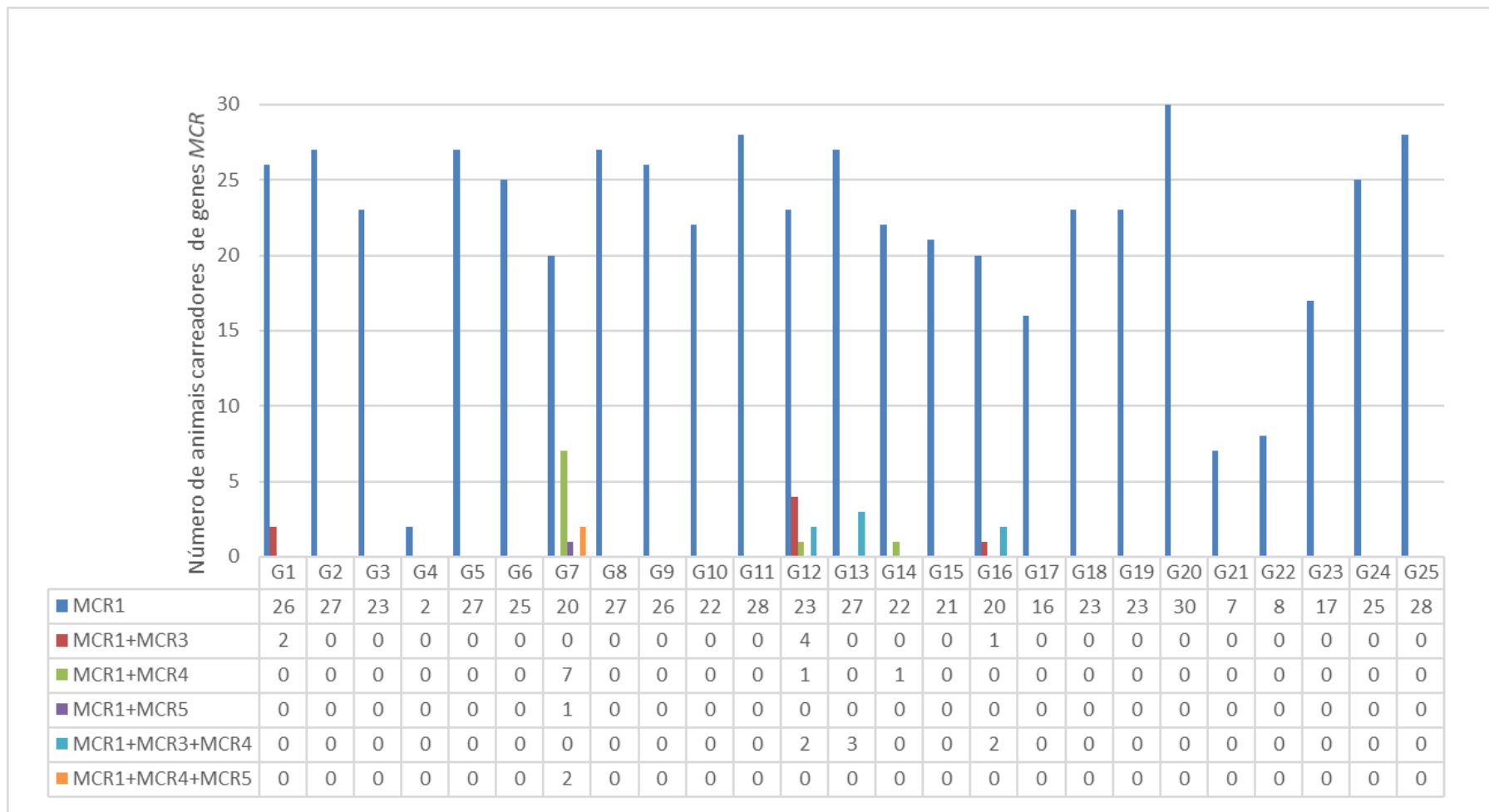


Gráfico 1 – Número de animais carreadores de estirpes de *E. coli* positivas para os diferentes genes de resistência a colistina (mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 e mcr-5) distribuídos de acordo com as granjas de origem.

6. DISCUSSÃO

A resistência aos antimicrobianos é um importante problema relacionados à saúde pública atualmente, o uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos em medicina veterinária e em medicina humana é associado frequentemente ao crescimento dos níveis de resistência antimicrobiana. Diversas espécies bacterianas têm sido consideradas de alto risco como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococos* resistentes à vancomicina (VRE), *Pneumococos* resistentes a penicilina (PRP) e bactérias Gram-negativas multirresistentes (RAO, 2008).

Dentre as espécies bacterianas isoladas no presente estudo, é descrita resistência intrínseca à colistina nas espécies *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri* e *Providencia stuartii* (BISWAS ET AL., 2012; SAMONIS ET AL., 2014). Após a descoberta de transferência da resistência a colistina por plasmídeos em 2015, há uma maior preocupação sobre o impacto que a resistência a este antimicrobiano pode gerar dentro do contexto da saúde pública, uma vez que estes mecanismos ameaçam a eficácia de tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas multirresistentes em ambientes hospitalares (SUN et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

No presente estudo, foram identificadas 15 espécies de 9 gêneros capazes de crescer na presença de colistina, relatos anteriores indicam uma variedade de agentes que podem apresentar genes *mcr* associados a este fenótipo de resistência, WISE et al., 2018 relatam a presença de genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr5* em estirpes de diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae*, sendo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* as espécies mais

frequentemente descritas. Isolados de amostras humanas advindas da América do Sul foram positivos para *mcr-1* em espécies bacterianas como *Escherichia coli*, *Citrobacter europaeus* e *Enterobacter hormaechei*, não foi detectado gene *mcr-2* (GIANI et al., 2018), nesses relatos o isolamento de estirpes de *E. coli* com gene *mcr* foi maior do que em outras espécies bacterianas identificadas, assim como no presente estudo, onde 65,45% das amostras resistentes a colistina foram identificadas como *E. coli* (1040/1589).

Existe uma alta prevalência desses elementos móveis codificadores de resistência a colistina dentro da produção de suínos no Brasil (ROCHA et al., 2017; CONCEIÇÃO-NETO et al., 2017; OLAITAN et al., 2016; SANCHEZ-BENITO et al., 2017; BARON et al., 2017; TERVEER et al., 2017; ROSCHANSKI et al., 2017; CORBELLÀ et al., 2017; LIASSINE et al., 2016) mesmo sem a utilização de colistina em nenhuma das fases de produção, todas as granjas pesquisadas apresentaram pelo menos um gene de resistência, e 24 das 25 granjas pesquisadas tem mais de 88% das amostras positivas para *mcr-1* – gene mais prevalente em todo mundo.

O único gene dentre os pesquisados que não foi identificado em nenhum dos 25 rebanhos, foi o *mcr-2*. O gene *mcr-2* ainda é pouco relatado nos estudos com bactérias isoladas de animais de produção (ROSCHANSKI et al., 2017; CLEMENTE et al., 2019; WANG et al., 2019). Em menor proporção, foi identificado o gene *mcr-5*, presente em apenas 0,2% (3/1040) das estirpes avaliadas e um rebanho, esses dados tem semelhança com outros relatos de estirpes isoladas de suínos onde também se verifica a ausência de *mcr-2* e uma porcentagem mínima de *mcr-5* (GARCÍA-MENIÑO et al., 2019). GARCIA et al. (2018) avaliando 186 estirpes de *E. coli* ETEC e STEC isoladas de suínos na Espanha entre 2006 e 2017, identificaram 76,9% de resistência à colistina, sendo que 102 estirpes foram positivas para *mcr-4*,

37 para mcr-1 e 5 para mcr-5, não havendo estirpes positivas para o gene mcr-2 e mcr-3.

No presente estudo o gene mcr-1 foi identificado em 94,4% (982/1040) das estirpes e 100 dos rebanhos, relatos anteriores também descrevem que o mcr-1 é o gene mais frequentemente identificado em enterobactérias que apresentam resistência a colistina (GIANI et al., 2018; CLEMENTE et al., 2019; WANG et al., 2019).

TONG et al. (2018) identificaram em 600 enterobactérias isoladas de suínos 76.2% positivas para mcr-1, outros relatos também descrevem este gene em maior proporção em estirpes isoladas de *E. coli* de suínos (GIANI et al., 2018; CLEMENTE et al., 2019; WANG et al., 2019). O gene mcr-1 apresenta uma alta circulação no Brasil, por isso medidas preventivas para evitar a transferência deste gene para diferentes patógenos e para os seres humanos torna-se necessária, VIA et al., 2019 descrevem que o uso de colistina exerce pressão de seleção direta para o acúmulo de mcr-1 nos dejetos, e além da proibição da utilização da colistina nos sistemas de produção de suínos também são necessárias outras medidas como digestão anaeróbica no processo de tratamento de resíduos para a remoção dos plasmídeos carreadores de mcr-1 dos resíduos ambientais.

Os resultados obtidos na granja 7 se destacam pela presença do maior número de isolados bacterianos resistentes a colistina e também o maior número de estirpes de *E. coli* isoladas (63/1040). Nesta granja foi possível observar ainda a ocorrência de estirpes carreando simultaneamente os genes mcr-1, mcr4 e mcr5. Situação semelhante ocorreu nas granjas 12, 13 e 16 em que se observa estirpes carreando os genes mcr1, mcr3 e mcr4. Estes dados, em comparação com as outras granjas nos leva a pensar que ocorrem diferentes mecanismos de transferência de material

genético e possivelmente estão relacionados com o manejo sanitário dos animais e resíduos de cada granja (YANG et al., 2020; GELBÍČOVÁ et al., 2019; VIA et al., 2019; ZHU et al., 2020)

Considerando a alta frequência dos genes de resistência a colistina e a importância deste antimicrobiano para o controle de infecções nosocomiais de bactérias Gram negativas multirresistentes em humanos, é de extrema importância que haja uma constante monitoria da resistência nos animais de produção e dos mecanismos de transferência envolvidos.

7. CONCLUSÕES

Todas as granjas estudadas apresentaram enterobactérias resistentes a colistina, evidenciando a circulação de genes de resistência em um grande número de sistemas de produção de suínos no Brasil.

A espécie bacteriana mais indicada para monitorar a disseminação dos genes relacionados a resistência a colistina em suínos foi a *Escherichia coli*, representando mais de 60% das estirpes resistentes ao antimicrobiano isolada no estudo.

Os dados obtidos evidenciam que o Brasil possui uma alta frequência de animais carregando genes de resistência a colistina nos sistemas de produção de suínos, sendo o gene *mcr-1* presente em todos os rebanhos examinados.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUOUN, Manal et al. mcr-1 and mcr-2 variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 72, n. 10, p. 2745-2749, 2017.

AINSWORTH, G. C.; BROWN, Annie M.; BROWNLEE, G. Aerosporin, an antibiotic produced by *Bacillus aerosporus* Greer. *Nature*, v. 160, n. 263, p. 878, 1947.

AL-TAWFIQ, Jaffar A.; LAXMINARAYAN, Ramanan; MENDELSON, Marc. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals?. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 54, p. 77-84, 2017.

ALBA, Patricia et al. Molecular Epidemiology of mcr-Encoded Colistin Resistance in Enterobacteriaceae From Food-Producing Animals in Italy Revealed Through the EU Harmonized Antimicrobial Resistance Monitoring. *Frontiers in microbiology*, v. 9, 2018.

ANDERSON, David B. et al. Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. *Pig News and Information*, v. 20, p. 115-122, 1999.

BARCELLOS, D. E. S. N. et al. Aspectos práticos sobre o uso de antimicrobianos em suinocultura. *Acta Scien. Vet*, v. 37, n. 1, p. 151-155, 2009.

BARON, Sophie et al. mcr-1 plasmid-mediated colistin resistance gene detection in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate in France. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2017.

BERGEN, Phillip J. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new?. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 74, n. 3, p. 213-223, 2012.

BI, Zhenwang et al. Prevalence of the mcr-1 colistin resistance gene in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from human faecal samples collected in 2012 in rural villages in Shandong Province, China. *International journal of antimicrobial agents*, v. 49, n. 4, p. 493-497, 2017.

BISWAS, Silpak et al. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert review of anti-infective therapy*, v. 10, n. 8, p. 917-934, 2012.

BOOM, R. C. J. A. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BOROWIAK, Maria et al. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 72, n. 12, p. 3317-3324, 2017.

BOYEN, Filip et al. Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. *Veterinary microbiology*, v. 144, n. 3, p. 359-362, 2010.

BUESS, Simone et al. Assessment of animals as a reservoir for colistin resistance: no MCR-1/MCR-2-producing *Enterobacteriaceae* detected in Swiss livestock. *Journal of global antimicrobial resistance*, v. 8, p. 33-34, 2017.

CARATTOLI, Alessandra et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*, v. 22, n. 31, 2017.

CARROLL, Laura M., et al. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *mBio*, 10.3: e00853-19, 2019.

CASAL, Jordi et al. Factors associated with routine mass antimicrobial usage in fattening pig units in a high pig-density area. *Veterinary research*, v. 38, n. 3, p. 481-492, 2007.

CATRY, Boudewijn, et al. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International journal of antimicrobial agents*, 46.3: 297-306, 2015.

CHEN, Li et al. Newly identified colistin resistance genes, *mcr-4* and *mcr-5*, from upper and lower alimentary tract of pigs and poultry in China. *PloS one*, v. 13, n. 3, p. e0193957, 2018.

CLEMENTE, Lurdes, et al. Revealing *mcr-1*-positive ESBL-producing *Escherichia coli* strains among *Enterobacteriaceae* from food-producing animals (bovine, swine

and poultry) and meat (bovine and swine), Portugal, 2010–2015. *International journal of food microbiology*, 296: 37-42, 2019.

COATES, Katie et al. 1.12 Å resolution crystal structure of the catalytic domain of the plasmid-mediated colistin resistance determinant MCR-2. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, v. 73, n. 8, p. 443-449, 2017.

CONCEIÇÃO-NETO, Orlando C. et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2017.

CONCEIÇÃO-NETO, Orlando C., et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *International journal of antimicrobial agents*, 50.2: 282, 2017.

CORBELLA, Marta et al. Three cases of *mcr-1*-positive colistin-resistant *Escherichia coli* bloodstream infections in Italy, August 2016 to January 2017. *Eurosurveillance*, v. 22, n. 16, 2017.

CROMWELL, Gary L. Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal biotechnology*, v. 13, n. 1, p. 7-27, 2002.

DIAS, Alexandre César, et al. Manual brasileiro de boas práticas agropecuárias na produção de suínos. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. p. 51, 2011.

DŽIDIĆ, Senka; ŠUŠKOVIĆ, Jagoda; KOS, Blaženka. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology & Biotechnology*, v. 46, n. 1, 2008.

EDQVIST, Lars-Erik; PEDERSEN, Knud Børge. 9. Antimicrobials as growth promoters: resistance to common sense. Late lessons from early warnings: the precautionary principle 1896–2000, p. 93, 2001.

FERNANDES, Miriam R. et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Eurosurveillance*, v. 21, n. 17, 2016.

FRACAROLLI, Isabela Fernanda Larios; DE OLIVEIRA, Samuel Andrade; MARZIALE, Maria Helena Palucci. Colonização bacteriana e resistência

antimicrobiana em trabalhadores. *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 30, n. 6, p. 651-657, 2017.

FUKUDA, Akira et al. High prevalence of *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-5* in *Escherichia coli* derived from diseased pigs in Japan. *International journal of antimicrobial agents*, v. 51, n. 1, p. 163-164, 2018.

GAO, Rongsui et al. Dissemination and mechanism for the MCR-1 colistin resistance. *PLoS pathogens*, v. 12, n. 11, p. e1005957, 2016.

GARCÍA MENIÑO, Isidro, et al. Genomic characterization of prevalent *mcr-1*, *mcr-4* and *mcr-5* *Escherichia coli* within swine enteric colibacillosis in Spain. *Frontiers in microbiology*, 10: 2469, 2019.

GARCIA-GRAELLS, Cristina et al. Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance, *mcr-1* and *mcr-2* Genes, in *Salmonella* spp. Isolated from Food at Retail in Belgium from 2012 to 2015. *Foodborne pathogens and disease*, v. 15, n. 2, p. 114-117, 2018.

GARCÍA, Vanesa, et al. Co-occurrence of *mcr-1*, *mcr-4* and *mcr-5* genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006-2017). *International journal of antimicrobial agents*, 52.1: 104-108, 2018.

GASKINS, H. R.; COLLIER, C. T.; ANDERSON, D. B. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Animal biotechnology*, v. 13, n. 1, p. 29-42, 2002.

GELBÍČOVÁ, Tereza, et al. Dissemination and comparison of genetic determinants of *mcr*-mediated colistin resistance in *Enterobacteriaceae* via retailed raw meat products. *Frontiers in Microbiology*, 10: 2824, 2019.

GIANI, Tommaso, et al. High prevalence of carriage of *mcr-1*-positive enteric bacteria among healthy children from rural communities in the Chaco region, Bolivia, September to October 2016. *Eurosurveillance*, 23.45, 2018.

GUYONNET, J. et al. Determination of a dosage regimen of colistin by pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modeling for treatment of GIT disease in pigs. *Research in veterinary science*, v. 88, n. 2, p. 307-314, 2010.

HAENNI, Marisa et al. Epidemic spread of *Escherichia coli* ST744 isolates carrying *mcr-3* and *bla* CTX-M-55 in cattle in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n. 2, p. 533-536, 2017.

HAMMERUM, Anette M.; HEUER, Ole E. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, n. 7, p. 916-921, 2009.

HERNÁNDEZ, Marta et al. Co-occurrence of colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from cattle, Spain, September 2015. *Eurosurveillance*, v. 22, n. 31, 2017.

HU, Menglong et al. Crystal Structure of *Escherichia coli* originated MCR-1, a phosphoethanolamine transferase for Colistin Resistance. *Scientific Reports*, v. 6, 2016.

JOENSEN, Katrine Grimstrup et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*, v. 52, n. 5, p. 1501-1510, 2014.

KAWANISHI, Michiko, et al. Prevalence of colistin resistance gene *mcr-1* and absence of *mcr-2* in *Escherichia coli* isolated from healthy food-producing animals in Japan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61.1: e02057-16, 2017.

KIEFFER, Nicolas et al. Genetic and functional characterization of an MCR-3-like enzyme-producing *Escherichia coli* isolate recovered from swine in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 62, n. 7, p. e00278-18, 2018.

KOIKE, M.; IIDA, K.; MATSUO, T. Electron microscopic studies on mode of action of polymyxin. *Journal of bacteriology*, v. 97, n. 1, p. 448, 1969.

KÜMMERER, Klaus. Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I. *Chemosphere*, v. 75, n. 4, p. 417-434, 2009.

LANDERS, Timothy F. et al. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public health reports*, v. 127, n. 1, p. 4-22, 2012.

LANDMAN, David et al. Polymyxins revisited. *Clinical microbiology reviews*, v. 21, n. 3, p. 449-465, 2008.

LESCAT, M.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Rapid multiplex PCR for detection of mcr-1 to-5 genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2018.

LI, Jian et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet infectious diseases*, v. 6, n. 9, p. 589-601, 2006.

LIASSINE, Nadia et al. Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract *Enterobacteriaceae* in Switzerland. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 51, p. 4-5, 2016.

LITRUP, Eva et al. Plasmid-borne colistin resistance gene mcr-3 in *Salmonella* isolates from human infections, Denmark, 2009–17. *Eurosurveillance*, v. 22, n. 31, 2017.

LIU, Bo; POP, Mihai. ARDB—antibiotic resistance genes database. *Nucleic acids research*, 37.suppl_1: D443-D447, 2008.

LIU, Jing-Yi, et al. Increased mcr-1 in pathogenic *Escherichia coli* from diseased swine, Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2018.

LIU, Lu et al. New variant of mcr-3 in an extensively drug-resistant *Escherichia coli* clinical isolate carrying mcr-1 and bla_{NDM-5}. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 61, n. 12, p. e01757-17, 2017.

LIU, Yi-Yun et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

LOUREIRO, Rui João et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

LOW, Donald E.; SCHELD, W. Michael. Strategies for stemming the tide of antimicrobial resistance. *Jama*, v. 279, n. 5, p. 394-395, 1998.

MA, Guixing et al. High resolution crystal structure of the catalytic domain of MCR-1. *Scientific reports*, v. 6, p. 39540, 2016.

MARTINS-SORENSEN, Natacha, et al. A novel plasmid-encoded mcr-4.3 gene in a colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2019, 75.1: 60-64.

MARTINS, F. M.; SANTOS FILHO, J. I.; TALAMINI, DJD. Conjuntura econômica da suinocultura brasileira. Embrapa Suínos e Aves-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E), 2018.

MORALES, Adriano Savoia et al. Colistin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains isolated from swine in Brazil. *The Scientific World Journal*, v. 2012, 2012.

MOREIRA, Leila Beltrami. Princípios para uso racional de antimicrobianos. *Rev. AMRIGS*, v. 48, n. 2, p. 118-120, 2004.

MOTA, Letícia M. et al. Uso racional de antimicrobianos. *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*, v. 43, n. 2, p. 164-172, 2010.

NEWTON, B. A. The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriological reviews*, v. 20, n. 1, p. 14, 1956.

NORDMANN, Patrice; POIREL, Laurent. Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace. *Clin Microbiol Infect*, v. 22, n. 5, p. 398-400, 2016.

Official Journal of the European Union (2010) Notices from European Union institutions, bodies, offices and agencies. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:C:2010:258:TOC>. Accessed 20 Feb 2016

OLAITAN, Abiola O.; MORAND, Serge; ROLAIN, Jean-Marc. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*, v. 5, p. 643, 2014.

OLAITAN, Abiola Olumuyiwa et al. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *The Lancet infectious diseases*, v. 16, n. 2, p. 146-147, 2016.

POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice. Emerging plasmid-encoded colistin resistance: the animal world as the culprit?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.71, n.8, p. 2326-2327, 2016.

QUIROGA, Cecilia; NASTRO, Marcela; DI CONZA, José. Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America. *Revista Argentina de microbiologia*, 51.1: 93-100, 2019.

RAMPELOTTO, Roberta Filipini et al. RESISTÊNCIA À COLISTINA EM ISOLADOS DE HEMOCULTURAS DE RECÉM-NASCIDOS ADMITIDOS EM UM HOSPITAL ESCOLA. *Saúde (Santa Maria)*, v. 43, n. 3, 2017.

RAO, G. Gopal. Risk factors for the spread of antibiotic-resistant bacteria. *Drugs*, 55.3: 323-330, 1998.

REBELO, Ana Rita et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Eurosurveillance*, v. 23, n. 6, 2018.

RHOUMA, Mohamed (a); BEAUDRY, Francis; LETELLIER, Ann. Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *International journal of antimicrobial agents*, v. 48, n. 2, p. 119-126, 2016(a).

RHOUMA, Mohamed et al. Colistin in pig production: chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 2016(b).

RHOUMA, Mohamed et al. In vivo therapeutic efficacy and pharmacokinetics of colistin sulfate in an experimental model of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in weaned pigs. *Veterinary research*, v. 47, n. 1, p. 58, 2016(c).

ROCHA, Igor Vasconcelos et al. Ciprofloxacin-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST410 strain carrying the mcr-1 gene associated with bloodstream infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 49, n. 5, p. 655-656, 2017.

ROER, Louise et al. Novel mcr-3 variant, encoding mobile colistin resistance, in an ST131 *Escherichia coli* isolate from bloodstream infection, Denmark, 2014. *Eurosurveillance*, v. 22, n. 31, 2017.

ROSCHANSKI, Nicole et al. Retrospective survey of mcr-1 and mcr-2 in German pig-fattening farms, 2011–2012. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2017.

ROSCHANSKI, Nicole, et al. Retrospective survey of mcr-1 and mcr-2 in German pig-fattening farms, 2011–2012. *International journal of antimicrobial agents*, 50.2: 266-271, 2017.

ROSSI, Flávia et al. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 21, n. 1, p. 98-101, 2017.

SALY, Marion et al. Prevalence of faecal carriage of colistin-resistant Gram-negative rods in a university hospital in western France, 2016. *Journal of Medical Microbiology*, 2017.

SAMONIS, G. et al. Trends of isolation of intrinsically resistant to colistin *Enterobacteriaceae* and association with colistin use in a tertiary hospital. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, v. 33, n. 9, p. 1505-1510, 2014.

SÁNCHEZ-BENITO, Rosario et al. *Escherichia coli* ST167 carrying plasmid mobilisable mcr-1 and bla CTX-M-15 resistance determinants isolated from a human respiratory infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2017.

SCHWARZ S, FEßLER, Andrea et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, n. 4, p. 619-625, 2010.

SCHWARZ, Stefan; JOHNSON, Alan P. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, n. 8, p. 2066-2070, 2016.

SHEN, Zhangqi, et al. Early emergence of mcr-1 in *Escherichia coli* from food-producing animals. *The Lancet infectious diseases*, 16.3: 293, 2016.

SMITH, David L. et al. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 9, p. 6434-6439, 2002.

STOJANOSKI, Vlatko et al. Structure of the catalytic domain of the colistin resistance enzyme MCR-1. *BMC biology*, v. 14, n. 1, p. 81, 2016.

STORM, Daniel R.; ROSENTHAL, Kenneth S.; SWANSON, Paul E. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annual review of biochemistry*, v. 46, n. 1, p. 723-763, 1977.

SUN, Jian et al. Deciphering MCR-2 Colistin Resistance. *mBio*, v. 8, n. 3, p. e00625-17, 2017.

TAMBADOU, Fatoumata et al. Characterization of the colistin (polymyxin E1 and E2) biosynthetic gene cluster. *Archives of microbiology*, v. 197, n. 4, p. 521-532, 2015.

TEO, Jeanette WP et al. *mcr-3* and *mcr-4* variants in carbapenemase-producing clinical *Enterobacteriaceae* do not confer phenotypic polymyxin resistance. *Journal of clinical microbiology*, v. 56, n. 3, p. e01562-17, 2018.

TERVEER, Elisabeth M. et al. Prevalence of colistin resistance gene (*mcr-1*) containing *Enterobacteriaceae* in feces of patients attending a tertiary care hospital and detection of a *mcr-1* containing, colistin susceptible *E. coli*. *PloS one*, v. 12, n. 6, p. e0178598, 2017.

TEUBER, Michael. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current opinion in microbiology*, v. 4, n. 5, p. 493-499, 2001.

TONG, Huixian, et al. High carriage rate of *mcr-1* and antimicrobial resistance profiles of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolates in swine faecal samples collected from eighteen provinces in China. *Veterinary microbiology*, 225: 53-57, 2018.

VEIGA, C. L. Os antibióticos na prática clínica. Lisboa: Infecon. 1984

VELKOV, Tony et al. Structure– activity relationships of polymyxin antibiotics. *Journal of medicinal chemistry*, v. 53, n. 5, p. 1898-1916, 2009.

VET01, C. L. S. I. S2 Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; second informational supplement. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.

VISEK, W. J. The mode of growth promotion by antibiotics. *Journal of Animal Science*, v. 46, n. 5, p. 1447-1469, 1978.

WANG, Xiaoming et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging microbes & infections*, v. 7, n. 1, p. 122, 2018.

WANG, XiuNa et al. The MCR-1 colistin resistance: a new challenge to global public health. *Chinese Science Bulletin*, v. 62, n. 10, p. 1018-1029, 2017.

WANG, Xudong et al. Structural and functional insights into MCR-2 mediated colistin resistance. *Science China Life Sciences*, p. 1-5, 2018.

WANG, Zheng, et al. Genetic environment of colistin resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* in *Escherichia coli* from one pig farm in China. *Veterinary microbiology*, 230: 56-61, 2019.

WISE, Mark G., et al. Prevalence of *mcr*-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. *PloS one*, 13.4: e0195281, 2018.

WOODFORD, Niel; ELLINGTON, Matthew J. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, 13.1: 5-18, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Containing antimicrobial resistance. 2005.

XAVIER, Basil Britto et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance*, v. 21, n. 27, 2016.

XU, Yongchang et al. Spread of MCR-3 colistin resistance in China: An epidemiological, genomic and mechanistic study. *EBioMedicine*, v. 34, p. 139-157, 2018.

YANG, Qiu E., et al. Compensatory mutations modulate the competitiveness and dynamics of plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* clones. *The ISME Journal*, 1-5, 2020.

YANG, Yong-Qiang et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n. 7, p. 1791-1795, 2018.

YIN, Wenjuan et al. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio*, v. 8, n. 3, p. e00543-17, 2017.

YU, Zhiliang et al. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *BioMed research international*, v. 2015, 2015.

ZANKARI, Ea et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 67, n. 11, p. 2640-2644, 2012.

ZAVASCKI, Alexandre Prehn et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 60, n. 6, p. 1206-1215, 2007.

ZHAO, Dongdong, et al. Coexistence of *mcr-1*, *blaKPC-2* and two copies of *fosA3* in a clinical *Escherichia coli* strain isolated from urine. *Infection, Genetics and Evolution*, 60: 77-79, 2018.

ZHAO, Feifei et al. Remarkable diversity of *Escherichia coli* carrying *mcr-1* from hospital sewage with the identification of two new *mcr-1* variants. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 2094, 2017.

ZHU, Lin, et al. Comprehensive understanding of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in aquatic environments. *Environmental Science & Technology*, 2019.

ZURFLUH, Katrin et al. Screening for fecal carriage of MCR-producing Enterobacteriaceae in healthy humans and primary care patients. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v. 6, n. 1, p. 28, 2017.