

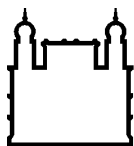
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE BACTÉRIAS RESISTENTES ÀS
POLIMIXINAS ISOLADAS DE SWAB DE CLOACA DE FRANGOS EM GRANJAS
DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

LEILANE DA SILVA PONTES

Rio de Janeiro
Junho de 2023



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Leilane da Silva Pontes

Avaliação fenotípica e genotípica de bactérias resistentes às polimixinas isoladas de swab de cloaca de frangos em granjas do estado do Rio de Janeiro

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências pela Pós-graduação em Medicina Tropical. Área de concentração: Diagnóstico, epidemiologia e controle de doenças infecciosas e parasitárias.

Orientador (es): Profa. Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef
Prof. Dr. Cláudio Marcos Rocha de Souza

RIO DE JANEIRO

Junho de 2023

Pontes, Leilane da Silva.

Avaliação fenotípica e genotípica de bactérias resistentes às polimixinas isoladas de swab de cloaca de frangos em granjas do estado do Rio de Janeiro / Leilane da Silva Pontes. - Rio de Janeiro, 2023.

xvi, 56 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2023.

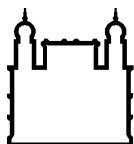
Orientadora: Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef.

Co-orientador: Cláudio Marcos Rocha de Souza.

Bibliografia: f. 45-55

1. Resistência Antimicrobiana. 2. Polimixinas . 3. Enterobacteriaceae. 4. Avicultura. 5. Gene *mcr* . I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

LEILANE DA SILVA PONTES

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE BACTÉRIAS RESISTENTES ÀS
POLIMIXINAS ISOLADAS DE SWAB DE CLOACA DE FRANGOS EM GRANJAS
DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**ORIENTADOR (ES): Profa. Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef
Prof. Dr. Cláudio Marcos Rocha de Souza**

Aprovada em: 06/06/2023

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Deyse Christina Vallim da Silva – Presidente – (IOC/FIOCRUZ)
Profa. Dra. Marina Galvão Bueno (IOC/FIOCRUZ)
Profa. Dra. Shana de Mattos de Oliveira Coelho (UFRRJ)
Profa. Dra. Maria Halina Ogrzewalska (IOC/FIOCRUZ)
Profa. Dra. Mara Lucia Penna Queiroz (UERJ)

Rio de Janeiro, 06 de junho de 2023

Dedico esta dissertação a minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por todas as oportunidades oferecidas durante essa jornada e por sempre me mostrar o melhor caminho a seguir.

A minha mãe Maria Aparecida, meu maior exemplo de determinação, força e coragem, e a minha irmã Lais por absolutamente tudo que já fez por mim. Agradeço por todo amor e cuidado que recebi durante toda a minha vida. Sem vocês eu não teria chegado nem na metade deste caminho. Amo vocês!

Ao meu namorado Bruno, por todo o apoio nos momentos mais difíceis. Pelo amor, paciência, companheirismo, carinho e compreensão nos momentos de ausência. Muito obrigada por tudo!

A minha orientadora Dra. Ana Paula Assef por me aceitar como aluna. Pela oportunidade, paciência e todo conhecimento transmitido. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Cláudio Rocha pelo apoio, incentivo e conhecimento transmitido durante todo o projeto.

À Dra. Miliane Moreira e ao Dr. Ramon Loureiro pela parceria e auxílio na coleta das amostras.

À coordenadora da Pós-Graduação em Medicina Tropical, Dra. Vanessa de Paula, e a secretária Lívia Mangeon por sempre serem solícitas e fazerem um trabalho tão exemplar.

Ao meu querido professor e amigo Orlando Neto que por meio das suas aulas me fez amar as bactérias e me incentivou nessa trajetória acadêmica. Sou grata por todos os ensinamentos, conselhos e amizade. Jamais esquecerei tudo o que já fez para me ajudar.

As minhas amigas Thamirys e Bianca por estarem comigo nos momentos mais difíceis e por me acolherem sem julgamentos. Sem vocês teria sido muito mais difícil. Obrigada por toda ajuda nos experimentos e convivência diária.

À equipe do LabSUR pelo auxílio na execução do projeto, em especial a Daiana, Melise, Stefany, Miriam, Camila e Bruno. Meu muito obrigada!

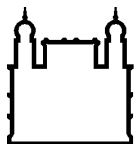
Às amigas e companheiras de Pós-graduação Caroline Lacorte, Daniela del Rosário e Ingrid Garrido por todo suporte durante as disciplinas, amizade, conselhos, trocas de conhecimento e convivência durante esse período. Vocês tornaram meus dias melhores.

Às agências de fomento, CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo apoio financeiro. Graças a isso pude concluir esta dissertação me dedicando exclusivamente.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para execução do presente trabalho.

“A ciência serve para nos dar uma ideia
de quão extensa é a nossa ignorância”.

(Félicité Robert de Lamennais)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

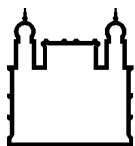
AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE BACTÉRIAS RESISTENTES ÀS POLIMIXINAS ISOLADAS DE SWAB DE CLOACA DE FRANGOS EM GRANJAS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Leilane da Silva Pontes

As polimixinas são classificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos antimicrobianos de maior prioridade na medicina humana. No entanto, com o amplo uso desses antimicrobianos em animais de produção e com o retorno da sua utilização na prática clínica humana, tem sido observado um aumento da resistência a essas drogas, o que é uma questão de grande preocupação. Assim, o presente estudo objetiva caracterizar fenotípica e genotipicamente amostras bacterianas resistentes às polimixinas a partir de “swab” de cloaca de frango. Para obtenção de isolados resistentes às polimixinas, os “swabs” foram semeados em meio de cultura EMB suplementado com 4 µg/mL de sulfato de colistina. As amostras que apresentaram crescimento foram identificadas por MALDI-TOF MS e submetidas ao teste de microdiluição em caldo para a determinação da concentração mínima inibitória. Apenas amostras resistentes (CIM >2 µg/mL) foram selecionadas para o estudo. A susceptibilidade a 18 antimicrobianos foi avaliada por disco difusão em ágar. Variantes alélicas do gene *mcr* foram pesquisadas por PCR e a determinação da diversidade genética foi realizada por PFGE. Por fim, ensaios de conjugação foram desenvolvidos para avaliação da transferência de genes de resistência às polimixinas. Das 125 amostras que cresceram no meio seletivo, 87 (69,6%) foram consideradas resistentes à polimixina, apresentando CIM que variaram de 8 µg/mL a 64 µg/mL, com CIM₅₀ = 16 µg/mL e CIM₉₀ = 32 µg/mL. 99% (124/125) das amostras foram identificadas como *Escherichia coli* e 1% (1/125) como *Klebsiella pneumoniae*. As maiores taxas de resistência encontradas foram para o ácido nalidíxico (60,9%) e tetraciclina (58,6%). As menores taxas de resistência foram observadas para a cefoxitina (1,1%), tigeciclina (3,4%) e cloranfenicol (5,7%). 75% dos isolados foram considerados MDR. O gene *mcr-1* foi identificado em 99% (86/87) dos isolados bacterianos e o *mcr-5* em 1% (1/87). As demais variantes não foram detectadas em nenhuma das amostras. O ensaio de conjugação demonstrou capacidade de mobilização de plasmídeos contendo o gene *mcr-1*. A análise do perfil clonal das nossas amostras permitiu observar uma grande diversidade genética, não havendo um clone prevalente entre as amostras. A alta prevalência de resistência às polimixinas e a presença de gene *mcr* em amostras isoladas de frangos alertam para a necessidade de identificação de amostras abrigando o gene *mcr*, com o objetivo de monitoramento da resistência antimicrobiana e de prevenção à disseminação desses microrganismos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC EVALUATION OF POLYMYXIN-RESISTANT BACTERIA ISOLATED FROM POULTRY CLOACAL SWABS ON FARMS IN RIO DE JANEIRO

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Leilane da Silva Pontes

Polymyxins are classified by the World Health Organization (WHO) as one of the highest priority antimicrobials in human medicine. However, with the widespread use of these antimicrobials in food-producing animals and the return of their use in human clinical practice, an increase in resistance to these drugs has been observed, which is a matter of great concern. The present study aims to phenotypic and genotypic characterization of bacterial strains resistant to polymyxins from poultry cloacal swab. To obtain polymyxin-resistant isolates, the swabs were streaked onto EMB agar supplemented with 4 µg/mL colistin sulfate. The samples were identified by MALDI-TOF MS and submitted to the broth microdilution to determine the minimum inhibitory concentration. Only resistant samples (MIC >2 µg/mL) were selected for the study. The susceptibility to 18 antimicrobials was assessed by disk diffusion in agar. Allelic variants of the *mcr* gene were screened by PCR and genetic diversity was evaluated by PFGE. Finally, conjugation assays were developed to evaluate the transfer of polymyxin resistance genes. Among 125 isolates grown onto selective medium, 87 (69.6%) were polymyxins resistant, showed MIC ranging from 8 to 64 µg/mL, with MIC₅₀= 16 µg/mL e MIC₉₀ = 32 µg/mL. 99% (124/125) of the isolates were identified as *Escherichia coli* and 1% (1/125) as *Klebsiella pneumoniae*. The highest rates of resistance found were for nalidix acid (60.9%) and tetracycline (58.6%). The lowest resistance rates observed for cefoxitin (1.1%), tigecycline (3.4%) and chloramphenicol (5.7%). 75% of the isolates were considered MDR. The *mcr-1* gene was identified in 99% (86/87) of the isolates and *mcr-5* in 1% (1/87). The other variants were not detected. The conjugation assays demonstrated the ability to mobilize plasmids containing *mcr-1* gene. The analysis of the clonal profile of our samples allowed us to observe a great genetic diversity, with no prevalent clone among the samples. The high prevalence of polymyxin resistance and the presence of *mcr* gene in poultry isolates alert to the need for identification of samples harboring the *mcr* gene, for the purpose of monitoring antimicrobial resistance and preventing the spread of these microorganisms.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
	1.1 Resistência antimicrobiana no contexto atual.....	1
	1.1.1 Mecanismos de resistência antimicrobiana	2
	1.2 A família Enterobacteriaceae	3
	1.3 Produção avícola brasileira.....	6
	1.4 Uso de antimicrobianos em animais de produção.....	8
	1.5 Polimixinas	10
	1.5.1 Mecanismo de ação das polimixinas	12
	1.5.2 Mecanismos de resistência às polimixinas	13
	1.6 Justificativa e relevância	17
2	OBJETIVOS	18
	2.1 Objetivo Geral.....	18
	2.2 Objetivos Específicos	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
	3.1 Coleta de material, obtenção e seleção de isolados resistentes às polimixinas.....	19
	3.1.1 Identificação dos isolados e determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para polimixinas.....	19
	3.2 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método da disco-difusão.....	21
	3.3 Investigação de gene plasmidial envolvido na resistência às polimixinas.....	22
	3.4 Tipagem genotípica por eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (“Pulsed-Field Gel Electrophoresis” – PGFE).....	24
	3.5 Avaliação da transferência de gene de resistência às polimixinas.....	26
	3.5.1 PFGE utilizando S1-nuclease	26
4	RESULTADOS	28
	4.1 Triagem de amostras resistentes às polimixinas	28

4.1.1	Identificação das espécies bacterianas	29
4.1.2	Frequência de resistência às polimixinas	29
4.2	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (difusão em ágar)	30
4.2.1	Análise dos perfis de multirresistência.....	31
4.3	Detecção de gene plasmidial envolvido na resistência às polimixinas.....	33
4.4	Avaliação da transferência de gene de resistência às polimixinas.....	33
4.5	Avaliação da diversidade genética através de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	35
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÕES	44
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
8	APÊNDICES E/OU ANEXOS	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Estrutura representativa das polimixinas B e E: heptapeptídeo cíclico com uma cadeia lateral tripeptídica. Thr: treonina; Phe: fenilalanina; Leu: leucina; Dab: ácido 2,4-diaminobutírico. Fonte: YU et al. (2015)11
- Figura 1.2** Ativação de genes modificadores de LPS envolvidos na resistência à polimixinas em bactérias Gram-negativas. Fonte: OLAITAN et al. (2014). Nota: as estrelas em vermelho representam genes onde foram identificadas mutações.....14
- Figura 3.1** Microplaca de titulação Policimbac® utilizada na determinação da CIM para polimixina B.....20
- Figura 4.1** Mapa de localização das 4 granjas, distribuídas em São José do Vale do Rio Preto, no estado do Rio de Janeiro. Nota: Os pontos em vermelho representam as granjas onde as coletas foram realizadas. As granjas 1,2 e 3 correspondem aos estabelecimentos de frangos de corte e a granja 4, a de postura caipira.....28
- Figura 4.2.** Distribuição por granja das amostras que apresentaram crescimento em meio EMB. As granjas 1,2 e 3 correspondem aos estabelecimentos de frangos de corte e a granja 4, a de postura caipira.....29
- Figura 4.3.** Variação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de polimixina nas 87 amostras selecionadas para o estudo.....30
- Figura 4.4** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 87 amostras resistentes à polimixina. Legenda: R= Resistente; I= Sensível aumentando exposição; S= Sensível.....31
- Figura 4.5** Foto de gel obtido por PFGE, utilizando a enzima S1. Legenda: PM = padrão molecular Lambda Ladder.....34
- Figura 4.6:** Dendrograma mostrando os perfis de fragmentação do DNA encontrados nas 86 amostras de *E. coli* resistentes às polimixinas. Nota: Os isolados com percentual de similaridade acima de 80% foram considerados pertencentes ao mesmo grupo clonal.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Antimicrobianos selecionados para verificação do perfil de suscetibilidade.....	22
Tabela 3.2. Iniciadores usados para detecção dos genes plasmidiais de resistência à polimixina.....	23
Tabela 4.1. Determinação da frequência de resistência à polimixina por granja.....	30
Tabela 4.2. Perfis de multirresistência determinados para 66 isolados de E. coli.....	32

SIGLAS E ABREVIATURAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
APEC	do inglês “Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i> ”, traduzido para <i>E. coli</i> patogênica aviária
BHI	do inglês “Brain Heart Infusion Agar”, traduzido para ágar infusão de cérebro e coração
BrCAST	do inglês “Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”, traduzido para Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos
CA-MHB	“Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth”
CCBH	Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMB	do inglês “Eosin Methylene Blue”, traduzido para eosina azul de metileno
ESBL	β -lactamase de espectro estendido
ExPEC	“Extraintestinal Pathogenic <i>Escherichia coli</i> ”
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
LabSUR	Laboratório de Bacteriologia Aplicada à Saúde Única e Resistência antimicrobiana
L-a-g-Dab	L-alfa-gama-diaminobutírico
L-Ara4N	4-amino-4-deoxi-L-arabinose
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI-TOF MS	“Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry”
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<i>mcr</i>	“Mobile colistin resistance”
MDR	“Multidrug-Resistant”

MLST	“Multilocus Sequence Typing”
NMEC	do inglês “Neonatal meningitis-causing <i>Escherichia coli</i> ”, traduzido para <i>E. coli</i> associada à meningite neonatal
OMS	Organização Mundial de Saúde
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
PCR	do inglês “Polymerase Chain Reaction”, traduzido para Reação em Cadeia da Polimerase
pEtN	Fosfoetanolamina
PFGE	do inglês “Pulsed-Field Gel Electrophoresis”, traduzido para eletroforese de campo pulsado em gel de agarose
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
RAM	Resistência antimicrobiana
TCS	do inglês “Two-Component Systems”, traduzido para Sistemas de Dois Componentes
UPEC	do inglês “Uropathogenic <i>Escherichia coli</i> ”, traduzido para <i>E. coli</i> uropatogênica

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resistência antimicrobiana no contexto atual

A introdução de antimicrobianos na prática clínica foi indiscutivelmente um dos maiores avanços da medicina moderna (1). Além de tratar doenças infecciosas, esses medicamentos possibilitaram muitos procedimentos médicos, incluindo tratamento de câncer, transplantes de órgãos e cirurgias (2). Contudo, o mau uso desses antimicrobianos resultou na rápida disseminação da resistência antimicrobiana (RAM) (3).

A RAM é considerada atualmente um dos maiores problemas de Saúde Pública, representando uma ameaça global crescente (4). A estimativa de mortes globais diretamente atribuídas às infecções bacterianas não tratáveis no ano de 2019 foi de 1,27 milhão, sendo a terceira principal causa de morte naquele ano (5). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que em 2050 a RAM pode ser responsável por 10 milhões de mortes por ano, caso nenhuma medida seja adotada a fim de retardar o seu aumento (6).

As bactérias multirresistentes (resistentes a três ou mais classes de antibióticos) possuem grande capacidade de colonização e de adaptação a diferentes ambientes, afetando não somente a saúde dos seres humanos, mas também dos animais domésticos e de produção, de vida selvagem, além de contaminar solos, cursos de água e alimentos, de origem vegetal e animal (7).

A globalização, contribuída pelo aumento da velocidade e do volume de viagens intercontinentais, corroborou para a rápida disseminação desses microrganismos através do deslocamento de pessoas e do comércio de animais vivos e alimentos (8). Além disso, à medida que a RAM se dissemina globalmente, os antimicrobianos tornam-se cada vez mais ineficazes impactando a conduta clínica, uma vez que infecções causadas por esses microrganismos requerem mais cuidados, sendo por vezes necessário recorrer a antibióticos alternativos mais caros (9).

Embora a RAM seja um fenômeno que ocorre naturalmente nas bactérias após a exposição a antibióticos, o uso indevido e excessivo desses fármacos na medicina humana, pecuária e agricultura contribuiu para a sua rápida evolução (9). Nesse

sentido, a medicina humana desempenhou um papel fundamental devido às prescrições inadequadas por parte de profissionais de saúde, disponibilidade de antibióticos sem receita médica e automedicação (10). Da mesma forma, o uso desses medicamentos na profilaxia, bem como promotor de crescimento de animais de produção, não somente está relacionado à contaminação da carne, leite e ovos com resíduos desses antibióticos, como também à pressão seletiva, que contribui ativamente na seleção de clones resistentes, juntamente com os potenciais impactos na saúde humana, já que esses microrganismos resistentes podem ser facilmente transmitidos por contato direto ou indireto (11).

Cada vez mais é fundamental que o pensamento de “compartimentalização” e de ações individualizadas sejam substituídas por abordagens multidisciplinares e integrativas. Assim, tendo em vista a complexidade do tema, uma das estratégias adotadas mundialmente para enfrentamento desse problema é a abordagem de Saúde Única (“One Health”). Essa abordagem reconhece que a saúde humana está intimamente relacionada à saúde animal e ao ambiente compartilhado, buscando uma visão mais única e ecológica não somente das doenças zoonóticas, mas também do aumento alarmante da detecção de bactérias multirresistentes e da disseminação de diferentes genes de resistência (12,13).

Nesse contexto, a OMS, Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) e Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) uniram forças para desenvolver um plano de ação global sobre RAM, com o objetivo de harmonizar estratégias intersetoriais que permitam coordenar políticas de saúde relacionadas a medicina humana, veterinária e saúde ambiental, destacando as responsabilidades de cada setor no combate a este problema global (14). Em nível nacional, o Ministério da Saúde elaborou um plano de prevenção e controle da RAM em convergência com os objetivos definidos no plano global. Algumas das estratégias propostas foram: melhorar a compreensão e conscientização a respeito da RAM, fortalecer a base científica por meio de vigilância e pesquisa, diminuir a incidência de infecções por meio de adoção de medidas eficazes e promover o uso racional de antimicrobianos na saúde humana e animal (15).

1.1.1 Mecanismos de resistência antimicrobiana

A RAM ocorre quando um microrganismo apresenta a capacidade de crescer “in vitro” na presença de concentração inibitória que o antimicrobiano atinge no sangue do hospedeiro durante o tratamento (16). Essa capacidade pode ser natural e estar intrinsicamente relacionada às características próprias da espécie ou então ser adquirida por meio de alterações genéticas (cromossômicas ou plasmidiais) que ocasionam modificações estruturais ou funcionais na célula bacteriana (17). Por exemplo, uma bactéria pode sofrer alterações em sua membrana celular que impedem a entrada de um fármaco, produzir enzimas que inativam antibióticos, alterar proteínas que atuam como alvo da droga, retirar ativamente o fármaco do meio intracelular por meio de bombas de efluxo ou ainda adquirir genes de resistência (16).

Muitos desses genes de resistência estão abrigados em elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, e podem ser transferidos horizontalmente para outras bactérias. Em particular, os plasmídeos conjugativos desempenham um papel importante na evolução de bactérias patogênicas porque são facilmente transferidos entre isolados da mesma espécie e também entre gêneros bacterianos distintos (17).

Dentro desse cenário, espécies da família Enterobacteriaceae possuem grande importância em virtude da sua notável capacidade de adquirir resistência e de causar infecções graves em humanos e animais (18). A ocorrência de Enterobacteriaceae resistente a múltiplas drogas vem sendo amplamente relatada em humanos, animais de produção, alimentos de origem animal e ambiente (19-23).

1.2 A família Enterobacteriaceae

Os bacilos Gram-negativos da família Enterobacteriaceae constituem um amplo e heterogêneo grupo de microrganismos, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos (24). Os membros desse grupo estão amplamente dispersos na natureza (solo, água e plantas) e habitam o intestino de humanos e animais (25).

A família Enterobacteriaceae pertence ao domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria e à ordem Enterobacterales (26). Em 2016, a nomenclatura da ordem foi modificada de Enterobacteriales para Enterobacterales, adequando-a as regras do Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (“International Code of Nomenclature of Bacteria”). Essa mudança foi proposta em um

estudo taxonômico que objetivou analisar filogeneticamente a antiga ordem Enterobacteriales. Nessa ocasião, os autores propuseram ainda a existência de outras seis famílias pertencentes a esta ordem: Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov. e Budviciaceae fam. nov. (27).

Atualmente, existem mais de 30 gêneros e 120 espécies de Enterobacteriaceae descritas (28). Todos os gêneros da família são catalase positivos, oxidase negativos, apresentam diferentes padrões de fermentação de carboidratos e diversos tipos de fatores de virulência (24).

Apesar das enterobactérias serem ubíquas na natureza e constituírem a microbiota de seres vivos, onde desempenham papéis fisiológicos importantes, algumas espécies de Enterobacteriaceae são consideradas patógenos oportunistas, responsáveis por causar uma variedade de doenças, desde infecções do trato urinário até pneumonia e sepse. Esses microrganismos são isolados em cerca de 50% dos pacientes com Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e compreendem 80% de todos os isolados dentre as bactérias Gram-negativas (29).

Em 2017, a OMS divulgou uma lista de patógenos prioritários para pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos. Nessa lista, espécies da família Enterobacteriaceae resistentes a carbapenemas e a terceira geração de cefalosporinas foram classificadas como prioridade crítica, incluindo *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (30).

Escherichia coli é um dos habitantes mais comuns do intestino grosso de animais de sangue quente (24). Como parte da microbiota normal, exerce papel fundamental no processo de saúde e doença, ajuda na produção de vitaminas e participa da digestão de alimentos (16).

E. coli normalmente não é patogênica, no entanto algumas cepas apresentam uma combinação de fatores de virulência que lhes permitem causar doenças intestinais e extraintestinais em indivíduos saudáveis e imunocomprometidos (31). A *E. coli* patogênica aviária (APEC), por exemplo, está relacionada à colibacilose em aves, incluindo frangos, perus, patos e muitas outras espécies. Em frangos jovens, essa doença é uma das principais causas de elevada mortalidade, cerca de 53,5%, e é responsável por condenações nos abatedouros causando grandes prejuízos econômicos a indústria avícola (32). É importante ressaltar que diversos estudos

sugerem que APEC é um potencial patógeno zoonótico de origem alimentar, bem como uma fonte de infecções extraintestinais em humanos. Isso se deve, em particular, à sua semelhança genética compartilhada com ExPECs humanos (*E. coli* uropatogênica - UPEC e *E. coli* associada à meningite neonatal - NMEC) (32-34).

Nas últimas décadas, tem-se observado o aumento das taxas de RAM em *E. coli* em ambientes hospitalares e na comunidade (35). Paralelamente, houve um número crescente de relatos do isolamento de *E. coli* virulentas e resistentes aos antimicrobianos em animais de produção, sobretudo em aves (36). A disseminação da resistência em *E. coli* está associada principalmente a elementos genéticos móveis, como plasmídeos, que também podem carrear determinantes de virulência (35). A grande disseminação de *E. coli* produtoras de ESBLs (β -Lactamase de Espectro Estendido) isoladas de amostras fecais de frangos saudáveis constitui um grave problema de segurança alimentar e pode estar relacionada ao uso de tetraciclina, sulfonamidas, e fluoroquinolonas, que podem contribuir para a co-seleção do perfil ESBL pela transferência de genes de resistência nos seus elementos genéticos móveis (37). Há também evidências que sugerem que esse aumento da RAM em *E. coli* está ligado à disseminação mundial de um clone específico, ST131. Esse clone está associado à resistência a fluoroquinolonas e à produção de ESBLs (38). O ST131 emergiu globalmente com duas variantes, a ST131-H30, que parece ser transmitido principalmente de pessoa para pessoa e variante H22 transmitida zoonoticamente através de aves domésticas, provocando infecções do trato urinário e urosepsia (39). Recentemente, a variante ST131-H22 foi isolada em frangos de corte apresentando colibacilose no Brasil. Esses isolados apresentaram um padrão de multirresistência e eram positivos para o gene *mcr-1* ("mobile colistin resistance"). Além disso, os isolados brasileiros eram relacionados filogeneticamente aos isolados de APEC circulante nas granjas de frango de corte nos Estados Unidos e aos isolados relacionados a casos de infecção do trato urinário humano na Austrália (40).

Em relação a *Klebsiella pneumoniae*, trata-se de um importante membro da família Enterobacteriaceae que ganhou notoriedade como agente infeccioso devido ao aumento do número de infecções graves em humanos e à crescente escassez de tratamentos eficazes (41). Esses bastonetes Gram-negativos estão presentes em uma variedade de nichos ambientais, incluindo solo, água e plantas, e colonizam algumas superfícies mucosas de mamíferos, como humanos, cavalos e porcos (24).

Em humanos, *K. pneumoniae* pode causar diferentes tipos de IRAS e infecções adquiridas na comunidade, incluindo infecções do trato urinário, pneumonia, abscesso hepático, infecções de sítio cirúrgico e infecções da corrente sanguínea, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Na prática clínica, essa espécie bacteriana tem sido reconhecida por sua grande capacidade de acumular resistência a diferentes classes de antimicrobianos, principalmente em ambientes hospitalares, e estão associados a altas taxas de mortalidade (42).

K. pneumoniae é um patógeno bem estudado e muitos estudos concentram-se em isolados clínicos de humanos, porém pouco se sabe sobre a ocorrência desse microrganismo em animais saudáveis e se cepas ou elementos genéticos associados às infecções humanas estão presentes na população animal (43).

1.3 Produção avícola brasileira

A avicultura no Brasil tem uma longa e interessante história. A criação de aves no país remonta ao período colonial, quando os portugueses trouxeram galinhas e outras aves para a região. No entanto, a avicultura comercial no país começou apenas na década de 1920. Nessa época, a criação de aves ainda era uma atividade de subsistência e as aves eram geralmente mantidas soltas em quintais ou pequenas propriedades (44).

Na década de 50, a avicultura industrial começou a se desenvolver no país quando os criadores começaram a adotar técnicas mais modernas de criação, como a produção de rações balanceadas. O setor avícola se expandiu rapidamente nas décadas seguintes, impulsionado pela crescente demanda por carne de frango e ovos. A partir de 1970, o desenvolvimento do setor avançou com a entrada no mercado de empresas especializadas na produção e processamento de carne de frango (44,45).

Atualmente, a avicultura é uma das principais atividades da indústria agropecuária do país, gerando empregos e movimentando a economia (45).

A produção avícola brasileira tem papel de destaque no mercado internacional de carnes. Ocupa a liderança na exportação de carne de frango, onde detém 35% desse mercado, e é o segundo maior produtor mundial desse produto. Segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2022, o Brasil produziu cerca

de 14,5 milhões de toneladas de carne de frango, um aumento de 4,6% em relação a 2021. Deste total, 66,8% foram destinados ao mercado interno e 33,2% foram exportados para mais de 150 países. Os principais destinos das exportações brasileiras são a China, os Emirados Árabes Unidos, o Japão e a Arábia Saudita (46).

Além da carne de frango, a avicultura brasileira também inclui a produção de ovos, com mais de 50 bilhões de unidades produzidas por ano. Em 2022, as exportações de ovos in natura totalizaram cerca de 9,4 mil toneladas (46).

A eficiência deste setor está relacionada a vários fatores, como inovações na área da genética, nutrição, manejo e sanidade, além do investimento em tecnologias e equipamentos que permitem melhorar os resultados e garantir a segurança alimentar (47). No entanto, desafios como reduzir os custos de produção e ampliar a produtividade ocasionam, eventualmente, aumento da densidade populacional na criação de frangos. Essa prática está relacionada diretamente ao desempenho produtivo das aves, e quando realizada de forma inadequada, impacta negativamente na qualidade de vida dos animais, além de facilitar a disseminação de doenças avícolas de impacto tanto em saúde pública como em saúde animal (48).

O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), tem como objetivo promover a sanidade e a qualidade dos produtos avícolas brasileiros, bem como garantir a proteção da saúde pública. O programa estabelece medidas para prevenir e controlar doenças avícolas, como a influenza aviária, salmonelose e a doença de Newcastle; define ações que possibilitam a certificação sanitária dos plantéis avícolas e incentiva a capacitação de profissionais envolvidos na cadeia produtiva (49).

Em relação ao monitoramento de agentes bacterianos, o MAPA preconiza controle sanitário periódico de salmonelas de interesse de saúde pública e animal em plantéis avícolas de reprodução, baseado na Instrução Normativa nº 78 de 3 de novembro de 2003 (50). Estabelece ainda o monitoramento de micoplasmose aviária em granjas, por meio da Instrução Normativa nº 44 de 23 de agosto de 2001 (51).

Em virtude dos prejuízos econômicos e riscos à saúde humana, as doenças bacterianas em aves devem ser constantemente monitoradas, mesmo as que não são de controle oficial pelo PNSA. Dados obtidos em um estudo recente demonstraram que cerca de 7% das carcaças de frangos foram condenadas entre 2009 e 2019. As principais causas de condenação foram contaminação, lesão traumática, dermatite,

aerossaculite e sepsse (52). Em diversos estudos dessa natureza, espécies bacterianas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Campylobacter jejuni* foram associadas às causas de condenações de carcaças (52-55).

1.4 Uso de antimicrobianos em animais de produção

A pecuária é um setor que apresentou notável crescimento nos últimos anos devido ao aumento da demanda por proteína animal (56). A produção mundial de carnes cresceu cerca de 110% nos últimos 30 anos, com perspectiva de crescimento adicional de 8% nos próximos dez anos (57). Com isso, o uso de antibióticos também aumentou nesse setor. Estima-se que mais de 70% dos antimicrobianos produzidos mundialmente são utilizados na pecuária (58). De acordo com a OIE, a quantidade total de agentes antimicrobianos destinado ao uso em animais em 2018 foi entre 69.455 e 76.704 toneladas. A tetraciclina foi o antimicrobiano mais utilizado, seguido das penicilinas (59).

Os antibióticos são utilizados na produção animal desde a década de 1950, sendo empregados de três principais formas: uso terapêutico, profilático e como promotores de crescimento (60). O uso terapêutico contempla a utilização desses fármacos em animais doentes com objetivo de tratar uma infecção bacteriana existente. Para profilaxia, os antimicrobianos são utilizados em doses terapêuticas em um indivíduo ou grupo de animais em risco de adquirir uma infecção específica, de forma a evitar a ocorrência de sinais clínicos. O uso de agentes antimicrobianos como promotores de crescimento objetiva o aumento das taxas de crescimento animal e eficiência alimentar enquanto reduz a mortalidade, e ocorre através de administração de subdoses desses antimicrobianos, principalmente junto à ração animal (61).

A utilização de antibióticos como promotores de crescimento em animais de produção é bastante controversa e tem sido contraindicada por órgãos de saúde internacionais. Seu mecanismo de ação não está completamente elucidado. De maneira geral, ocorre a redução da carga bacteriana no intestino dos animais, redução de metabólitos microbianos depressores do crescimento e o aumento da absorção de nutrientes, acarretando o acréscimo diário de ganho de peso e, conseqüentemente, uma melhor conversão alimentar. Em contrapartida, essa utilização pode eliminar

bactérias comensais da microbiota intestinal e aumentar a possibilidade de cepas patogênicas e resistentes aos antimicrobianos colonizarem o intestino destes animais (58).

A OMS recomenda fortemente que classes de antimicrobianos importantes na terapêutica humana, ou conhecidos por selecionar resistência cruzada, não sejam utilizados como promotores de crescimento ou para prevenir doenças sem diagnóstico prévio em animais (62). Seguindo essas orientações, diversos países já adotaram medidas para reduzir o uso de antibióticos em animais produtores de alimentos. Desde 2006, por exemplo, a União Europeia proibiu o uso dessas substâncias como promotores de crescimento (63). Porém, a quantidade de antibióticos utilizados em animais produtores de alimentos continua a aumentar em todo o mundo, devido à crescente demanda por alimentos de origem animal, produzidos em sua grande maioria em regimes de criação intensiva, para alimentar uma população humana em constante crescimento (62). Logo, associar boas práticas de manejo e de bem-estar animal, programas de vacinação eficazes, e a utilização clínica racional dos antibióticos, é a chave de uma abordagem “Uma Só Saúde” no combate e controle da RAM (64).

No Brasil, o MAPA limitou ao longo dos últimos anos o uso de diversos antimicrobianos com finalidade de aditivos melhoradores de desempenho. As restrições se iniciaram com a proibição do uso da avoparcina a partir de 1998 e, atualmente, também estão proibidas as classes e/ou substâncias antimicrobianas tetraciclina, anfenicóis, β -lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas, sulfonamidas sistêmicas, eritromicina, espiramicina, colistina, e mais recentemente, tilosina, lincomicina, e tiamulina (65). Além disso, todas as substâncias antimicrobianas utilizadas na produção animal brasileira devem ser informadas no Boletim Sanitário dos Animais, documento oficial obrigatório que acompanha os lotes no momento do abate, e os produtores devem respeitar o período de carência compreendido entre a administração do fármaco e o abate dos animais, evitando, desse modo, a presença de resíduos nos produtos de origem animal que serão consumidos (66).

Cabe ressaltar que a colistina (polimixina E) foi amplamente utilizada no sistema brasileiro de criação intensiva para tratamento e prevenção de doenças infecciosas, e como promotor de crescimento, sobretudo na avicultura e suinocultura

(67). No entanto, após a presença de *E. coli* resistente à colistina associada ao gene mobilizável *mcr-1* ser confirmada em humanos e animais, incluindo frangos, suínos e bovinos, o uso de colistina na ração animal foi banido pelo MAPA em novembro de 2016, seguindo as recomendações internacionais da Organização Mundial da Saúde (68).

Atualmente, encontram-se em estudo diferentes alternativas aos antibióticos, que possam ser aplicadas no manejo intensivos de frangos, como os probióticos, prebióticos, enzimas, ácidos orgânicos, e produtos de exclusão competitiva (microbiota bacteriana intestinal que limita a colonização por algumas bactérias patogênicas) (69).

1.5 Polimixinas

As polimixinas são um grupo de antibióticos polipeptídicos catiônicos com atividade bactericida, conhecidos desde a década de 40. Constituem um grupo de cinco substâncias intimamente relacionadas, polimixinas A a E, sendo esta última também chamada de colistina. Apenas as polimixinas B e a colistina são utilizadas na prática clínica, em virtude da grande toxicidade das demais. Ambas compartilham o mesmo mecanismo de ação, e se diferenciam por apenas um aminoácido. A polimixina B é produzida pela espécie ambiental *Paenibacillus polymyxa*, e a colistina por *Paenibacillus polymyxa* subsp. *colistinus* (70).

A estrutura química básica desses antimicrobianos é composta por um anel peptídico contendo dez aminoácidos com elevada porcentagem de resíduos de ácido L-alfa-gama-diaminobutírico (L- α - γ -Dab) e uma cadeia de ácido graxo ligado ao anel peptídico através de uma ligação amida. Os resíduos de L- α - γ -Dab são ionizados em pH fisiológico e, portanto, as moléculas de polimixina apresentam uma carga líquida positiva. Além disso, elas possuem regiões hidrofóbicas, como a cadeia de ácido graxo. Por possuírem domínios hidrofílicos e hidrofóbicos essas moléculas são consideradas anfipáticas, característica primordial para seu mecanismo de ação (71).

A polimixina B e a colistina compartilham uma sequência primária quase idêntica, com principal diferença na posição 6 do anel peptídico, sendo uma fenilalanina na polimixina B e uma leucina na colistina (Figura 1.1). Outra diferença é

a forma como são administradas por via parenteral. A polimixina B é utilizada diretamente como sulfato de polimixina, enquanto a colistina é administrada como um pró-fármaco, metanossulfonato de colistina. (72).

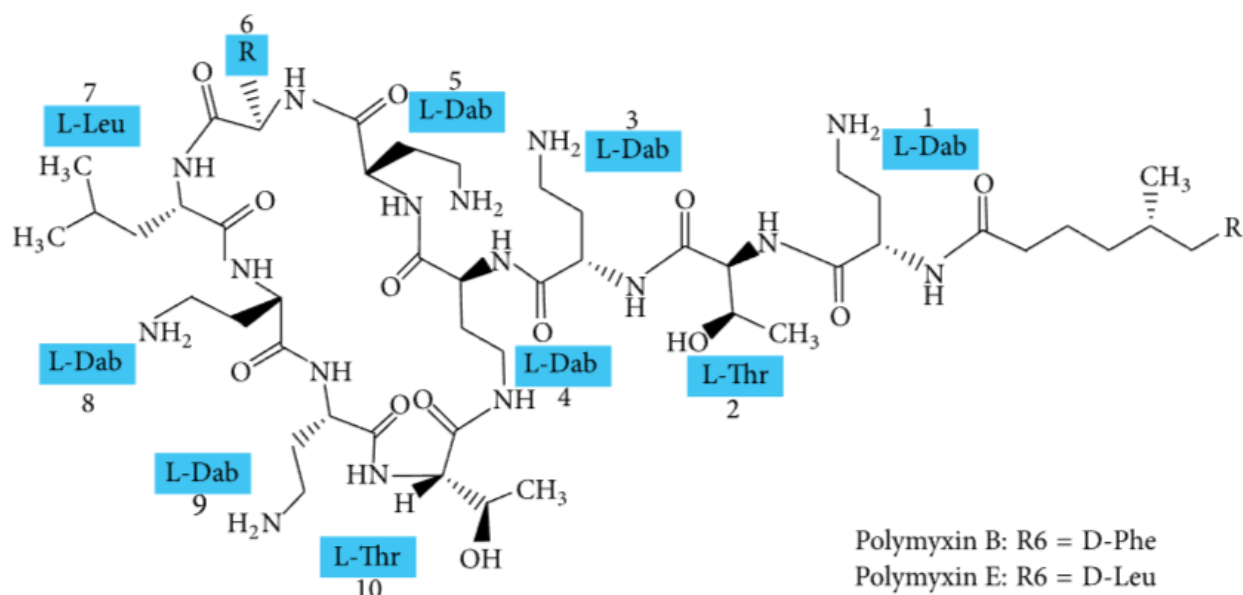


Figura 1.1 Estrutura representativa das polimixinas B e E: heptapeptídeo cíclico com uma cadeia lateral tripeptídica. Thr: treonina; Phe: fenilalanina; Leu: leucina; Dab: ácido 2,4-diaminobutírico. Fonte: YU et al. (2015).

Esses antimicrobianos possuem amplo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas, incluindo a maioria das espécies da ordem Enterobacterales e os Gram-negativos não fermentadores de glicose, como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Por outro lado, algumas espécies são intrinsecamente resistentes às polimixinas, incluindo *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium* spp., *Edwardsiella* spp. (73).

Apesar de possuir atividade comprovada há muitas décadas, esses fármacos tiveram seu uso na prática clínica humana gradualmente abandonado, em razão de relatos dos seus efeitos nefrotóxicos e neurotóxicos. No início da década de 1980, as polimixinas foram substituídas pelos aminoglicosídeos e cefalosporinas de amplo espectro, que apresentavam o mesmo espectro de ação, sem os efeitos colaterais indesejados, e sua utilização ficou restrita ao tratamento de infecções pulmonares

ocasionadas por bastonetes Gram-negativos multirresistentes em pacientes com fibrose cística. Contudo, o surgimento de bactérias resistentes à maioria das classes de antibióticos disponíveis comercialmente e a escassez de novos agentes antimicrobianos com atividade contra microrganismos Gram-negativos levaram à reconsideração das polimixinas como uma valiosa opção terapêutica (72).

De maneira oposta ao seu uso na medicina humana, a colistina tem sido utilizada há décadas na medicina veterinária para tratamento e prevenção de doenças infecciosas ou como aditivo alimentar para promover o crescimento em animais produtores de alimentos (71). A utilização desse antimicrobiano nesse setor é conhecida desde meados do século XX, principalmente em países de baixa e média renda. Entre 2000 e 2010, o consumo de colistina aumentou cerca de 13% na Índia, Brasil, Rússia, China e África do Sul (74). Na China, o uso anual desse fármaco em animais produtores de alimentos variou de 2.470 a 2.875 toneladas de 2011 a 2015, o que tornou a China o maior usuário de polimixinas do mundo (75).

1.5.1 Mecanismo de ação das polimixinas

As polimixinas exercem sua atividade bactericida a partir da interação eletrostática entre a carga positiva dos resíduos de L- α - γ -Dab presentes em sua molécula, e a carga negativa dos grupamentos fosfato existentes no lipídeo A do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, portanto, o alvo desses antimicrobianos é a membrana externa de bactérias Gram-negativas. Essa interação desloca competitivamente íons cálcio e magnésio, promovendo o aumento da permeabilidade da membrana e liberação dos componentes celulares, levando conseqüentemente à morte celular bacteriana (76).

Embora vários estudos indiquem que a interação das polimixinas com a membrana externa seja o principal mecanismo de ação, ainda existem lacunas se essa interação é o suficiente para causar morte celular bacteriana. Assim, alvos secundários envolvidos na atividade bactericida desses fármacos estão sendo propostos, porém permanecem pouco caracterizados (71).

Um dos possíveis mecanismos secundários de ação das polimixinas é a inibição de vias metabólicas relacionadas à respiração celular em bactérias Gram-negativas, com inibição da enzima NADH-quinona oxirredutase tipo II que atua no transporte de elétrons na membrana interna dessas bactérias (77).

O efeito anti-endotoxina é outro mecanismo secundário proposto. A endotoxina dos Gram-negativos corresponde à porção lipídica A do LPS; as polimixinas têm a capacidade de se ligar e neutralizar essa molécula liberada após a lise celular (71).

1.5.2 Mecanismos de resistência às polimixinas

Com a reintrodução das polimixinas na prática clínica humana, especialmente no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes, observou-se um aumento da prevalência de cepas resistentes a essa classe de antimicrobiano. A resistência adquirida às polimixinas já foi descrita em vários gêneros da família Enterobacteriaceae, como *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Salmonella* (78).

Os mecanismos de resistência a esses fármacos são codificados por genes cromossômicos e plasmidiais relacionados à modificação da carga do LPS, por substituição ou adição de moléculas catiônicas, tais como a 4-amino-4-deoxi-L-arabinose (L-Ara4N) e a fosfoetanolamina (pEtN). Conseqüentemente, ocorre a redução da carga líquida negativa do LPS e com isso, diminui a atração da membrana externa pela polimixina, que é positivamente carregada (78,79).

Os sistemas de dois componentes (“two-component systems”, TCS) PmrA/PmrB e PhoQ/PhoP, regulados pelo gene *mgrB* já foram descritos como mediadores dessa adição, em resposta a determinados estímulos externos, como a presença de peptídeos antimicrobianos, depleção de cátions divalentes, pH baixo e presença de ferro trivalente (72,79).

O mecanismo molecular que leva a adição de moléculas ao LPS envolve a ativação das proteínas quinases integrais de membrana PhoQ e PmrB levando à fosforilação dos reguladores de resposta PhoP e PmrA, respectivamente. A fosforilação de PhoP aumenta a transcrição de vários genes, incluindo *pmrD*, uma proteína que exerce efeito de “feedback”, conectando os sistemas PhoPQ e PmrAB por meio da sua capacidade de ativar PmrA. Uma vez ativado, PmrA leva à regulação positiva dos operons *arnBCADTEF* e *pmrCAB*, que são responsáveis pela síntese e a transferência de L-Ara4N e PEtN, respectivamente, para o lipídeo A (Figura 1.2). Assim, mutações nos genes que codificam essas proteínas estão relacionadas à ativação de genes que resultam na adição de moléculas positivamente carregadas ao LPS bacteriano. Outras alterações, como inserções ou deleções de pequenas

sequências de nucleotídeos no gene *mgrB*, ou mesmo algumas deleções completas do locus *mgrB* também estão relacionadas à resistência adquirida às polimixinas. O gene *mgrB* atua como regulador negativo de PhoPQ e sua inativação acarreta a superexpressão desse TCS (79).

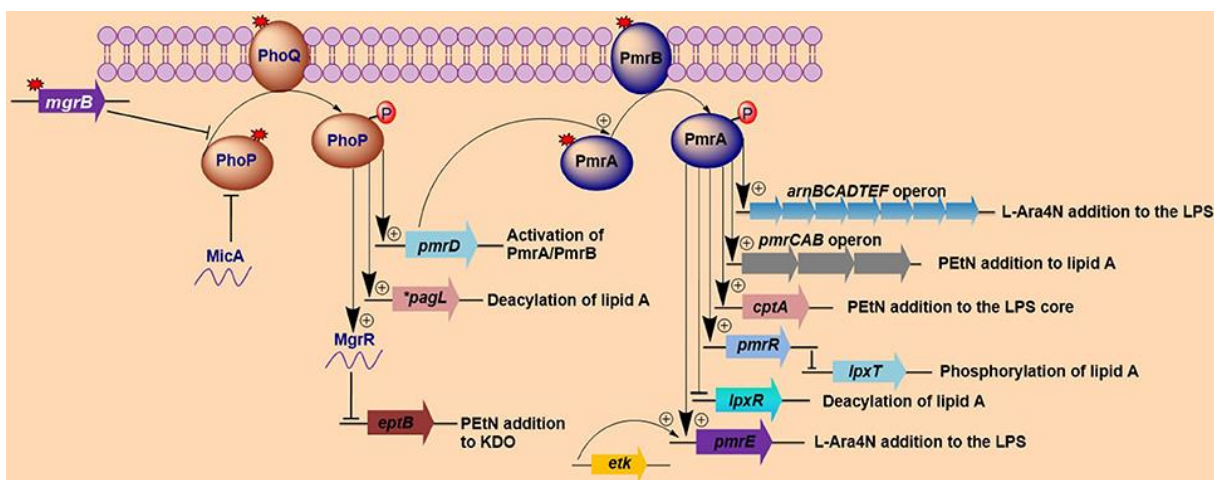


Figura 1.2 Ativação de genes modificadores de LPS envolvidos na resistência à polimixinas em bactérias Gram-negativas. Fonte: OLAITAN et al. (2014). Nota: as estrelas em vermelho representam genes onde foram identificadas mutações.

Mutações nesses sistemas já foram descritos causando resistência em *E. coli* e em *K. pneumoniae*. Além disso, a inativação do gene *mgrB* é frequentemente responsável pela resistência em *K. pneumoniae* (79).

Até recentemente, acreditava-se que a resistência às polimixinas era adquirida apenas por meios de mutações cromossômicas (80-83). Em novembro de 2015, foi identificado um novo mecanismo de resistência a estes antimicrobianos mediado por gene mobilizável, localizado em plasmídeo. O gene *mcr-1* foi descrito pela primeira vez na China em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* recuperados de animais de produção (frangos e porcos), humanos e alimentos entre 2011 e 2014 (84). Após o primeiro relato, o gene *mcr-1* foi descrito em 11 espécies da família Enterobacteriaceae e em diversos países, tendo em vista a sua característica de transferência horizontal (85).

O gene *mcr-1* codifica a proteína MCR-1, com atividade fosfoetanolamina-transferase. Sua aquisição resulta na adição de fosfoetanolamina ao lipídeo A e, conseqüentemente, em um LPS mais catiônico, semelhante às mutações cromossômicas mencionadas acima. No geral, a produção de MCR-1 leva a aumentos

de 4 a 8 vezes das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de polimixinas. Portanto, sem mecanismos de resistência adicionais, a sua produção é suficiente para conferir resistência a essa classe de antimicrobianos (71,84). Atualmente, 22 variantes genéticas funcionais de *mcr-1* foram detectadas (de *mcr-1.1* a *mcr-1.22*). Essas variantes diferem do *mcr-1* por um ou alguns aminoácidos. Além disso, todos eles têm uma alta identidade nucleotídica (~99%) e, portanto, conferem um efeito semelhante na resistência às polimixinas (85).

No ano seguinte a identificação do *mcr-1*, a variante *mcr-2* foi identificada em *E. coli* isoladas de suínos e bovinos na Bélgica. O referido gene estava localizado em um plasmídeo do tipo IncX4 e apresentava 80,65% de similaridade nucleotídica em relação ao *mcr-1* (86).

Em junho de 2017, Yin e colaboradores identificaram a terceira variante (*mcr-3*) em uma amostra fecal de um porco saudável na China. O gene *mcr-3* mostrou 32,5% de identidade nucleotídica em relação ao *mcr-1* e 31,7% em relação ao *mcr-2* (87). No mesmo ano, o gene *mcr-4* foi descrito em cepas de *Salmonella* e *E. coli* oriundas de suínos na Itália, Espanha e Bélgica. Os autores realizaram um estudo retrospectivo em amostras coletadas nos anos de 2013, 2015 e 2016 que apresentavam resistência à colistina, porém eram negativos para os genes *mcr* descritos até aquele momento. A identificação da nova variante foi realizada por sequenciamento do genoma completo e MCR-4 tem, respectivamente, uma identidade de sequência de aminoácidos de 34%, 35% e 49% para MCR-1, MCR-2 e MCR-3 e, como outras fosfoetanolamina-transferase, pode mediar a resistência à colistina através da modificação do Lipídeo A (88).

Ainda em 2017, Borowiak e colaboradores realizaram a primeira detecção da variante alélica *mcr-5* em cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Paratyphi B, isoladas de aves e alimentos na Alemanha. Nesse estudo, a resistência à polimixina em um dos isolados foi associada a presença de um transposon integrado ao cromossomo bacteriano (89).

A detecção do gene *mcr-6* foi realizada em isolados de *Moraxella pluranimalium* recuperados de suínos no Reino Unido. Esse gene estava inserido no cromossomo bacteriano e apresentou 87,9% de identidade em relação ao *mcr-2*. Até o presente momento, esta foi a única descrição do gene *mcr-6* (90).

Em um estudo realizado por Yang e colaboradores (2018), o gene *mcr-7.1* foi identificado em isolados de *K. pneumoniae*, oriundos de frangos na China. Este gene compartilhava 70% de identidade nucleotídica com o gene *mcr-3*, estava contido em um plasmídeo do grupo de incompatibilidade IncI2 e, em um dos isolados, coexistia com o gene de ESBL *blaCTX-M-55* (91).

A variante alélica *mcr-8* foi detectada em *Klebsiella pneumoniae* produtora de NDM (New Delhi metalo- β -lactamase) ainda em 2018, na China. A nova variante estava localizada em um plasmídeo tipo IncFII e sua sequência de aminoácidos demonstrou 31,08%, 30,26%, 39,96%, 37,85%, 33,51%, 30,43% e 37,46% de similaridade com *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6* e *mcr-7*, respectivamente (92).

Em 2019, o gene *mcr-9* foi identificado por Carroll e colaboradores em isolado de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium, multirresistente e susceptível à colistina, recuperado em 2010 de um paciente humano no estado de Washington/EUA. Apesar do *mcr-9* ter sido detectado em uma cepa sensível à colistina, foi demonstrando por ensaios de mobilização de plasmídeo que a sua aquisição pela cepa receptora, *E. coli* NEB5 α , foi capaz de conferir resistência à colistina. Posteriormente, a nova variante foi identificada em ambientes nosocomiais e em animais produtores de alimentos e está amplamente distribuída em Enterobacteriaceae, particularmente em *Enterobacter* spp. (93).

A última variante descrita, até o momento, foi o *mcr-10*, que foi identificado em um plasmídeo IncFIA de uma cepa clínica de *Enterobacter roggenkampii* na China. Essa variante tem similaridade nucleotídica de 79,69% em relação ao *mcr-9* e confere aumento de 4 vezes na CIM de colistina (de 1 para 4 mg/L), quando clonado em uma cepa de *E. roggenkampii* suscetível a este antimicrobiano (94).

A coexistência de genes mobilizáveis de resistência às polimixinas já é descrita na literatura. Um estudo realizado em 2017 relatou a presença dos genes *mcr-1* e *mcr-3* em um isolado de *E. coli* oriundo de bovinos na Espanha. Ambos estavam contidos em um plasmídeo do tipo IncHI2 (95). Mais recentemente, a ocorrência simultânea de *mcr-2* e *mcr-3* no cromossomo de *E. coli* recuperada de fezes de indivíduos saudáveis na Tailândia foi descrita por Phuadraksa e colaboradores (2022) (96).

A facilidade com que os genes da família MCR são transferidos horizontalmente fez com que eles se disseminassem em todo o mundo, resultando

em uma variedade de espécies bacterianas apresentando maior tolerância às polimixinas. De acordo com Ling e colaboradores (2020), entre os genes da família, *mcr-1* e *mcr-9* são os mais amplamente disseminados, sendo identificados em isolados de 61 e 40 países em seis continentes, respectivamente. O *mcr-3* e *mcr-5* são os próximos mais difundidos, sendo detectados em 22 e 15 países, respectivamente (97).

1.6 Justificativa e relevância

A resistência bacteriana é um problema complexo e multifacetado, que representa uma das 10 maiores ameaças à saúde pública, sobretudo quando se considera a resistência às polimixinas, visto que são antimicrobianos considerados de maior prioridade na medicina humana, utilizados no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, principalmente nas resistentes aos carbapenemas.

Os genes mobilizáveis de resistência às polimixinas são de notável interesse epidemiológico, e sua alta prevalência em isolados oriundos de animais produtores de alimentos, sobretudo em frangos, em todo o mundo apontam para a hipótese de que esses animais podem servir de reservatórios de resistência a essa classe de antimicrobianos, em virtude da pressão seletiva exercida pelo extensivo uso de colistina na medicina veterinária. Desse modo, esses microrganismos abrigando genes *mcr* podem ser transmitidos para humanos por contato direto ou indireto. Assim, há a necessidade urgente de se pensar em saúde de forma unificada (ambiente-animal-humano).

A relevância do gene *mcr* no cenário mundial de resistência antimicrobiana é crescente. Com o aumento alarmante do número de relatos de bactérias resistentes e a possibilidade da transferência horizontal de *mcr* para essas cepas, o monitoramento desse gene na cadeia alimentar precisa ser estabelecido como uma prioridade, para evitar sua disseminação.

Sendo assim, torna-se relevante a identificação de cepas abrigando genes *mcr*, com o objetivo de monitoramento da resistência antimicrobiana e de prevenção à disseminação de microrganismos resistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar fenotípica e genotipicamente amostras bacterianas resistentes às polimixinas previamente isoladas de diferentes granjas localizadas no Estado do Rio de Janeiro e estocadas pelo Laboratório de Bacteriologia Aplicada à Saúde Única e Resistência antimicrobiana (LabSUR) do IOC/FIOCRUZ.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência de resistência às polimixinas e as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de Polimixina B;
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em amostras de Enterobacterales resistentes às polimixinas;
- Avaliar a presença das variantes alélicas (*mcr-1* a *mcr-9*) do gene plasmidial envolvido na resistência às polimixinas, através de PCR;
- Avaliar a transferência de genes de resistência às polimixinas, caso seja detectado um gene plasmidial de resistência às polimixinas;
- Avaliar a relação de clonalidade entre as amostras resistentes às polimixinas oriundas de diferentes granjas situadas no Estado do Rio de Janeiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de material, obtenção e seleção de isolados resistentes às polimixinas

No período de julho de 2019 a março de 2020, foi realizada a coleta do material em 4 diferentes granjas localizadas em São José do Vale do Rio Preto, no estado do Rio de Janeiro. A coleta foi realizada em colaboração com o Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Trata-se de um projeto integrado a um maior, sob CEUA nº 6239180418 (CEUA/UFRRJ).

O material fecal foi coletado pela introdução de “swab” na cloaca, comprimindo-o, em movimentos rotatórios suaves, após a contenção dos animais. Em seguida, os “swabs” foram acondicionados em meio de transporte Cary Blair para posterior processamento no LabSUR.

Para a obtenção de colônias polimixina resistentes, os “swabs” foram semeados em meio ágar “Eosin Methylene Blue” (EMB) (Oxoid, UK) acrescido de 4µg/mL de sulfato de colistina (Sigma- Aldrich, EUA). O meio EMB foi escolhido por se tratar de um meio seletivo empregado no isolamento de bactérias Gram negativas. Como controle de qualidade do meio, foram utilizadas as cepas *E. coli* ATCC 25922 (suscetível à colistina), *Proteus mirabilis* CCBH (Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar) 22517 (intrinsecamente resistente à colistina) e *E. coli* CCBH 23595 (cepa resistente à colistina, $CIM_{colistina}= 4 \mu\text{g/mL}$, *mcr-1*-positiva).

3.1.1 Identificação dos isolados e determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para polimixinas

As amostras que apresentaram crescimento em meio seletivo foram identificadas através da técnica de “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry” (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Germany). Espécies bacterianas intrinsecamente resistentes às polimixinas foram descartadas.

Para confirmação de resistência dos isolados identificados, a CIM para polimixina foi determinada por microdiluição em caldo, utilizando o teste comercial Policimbac® (Probac do Brasil).

O Policimbac® consiste em uma microplaca de titulação desenvolvida para determinação da CIM de polimixina B para bacilos Gram negativos. Cada microplaca possui doze poços por linha, com capacidade para dois testes, conforme pode ser observado na figura 3.1. Os poços 1 a 10 contêm caldo Muller-Hinton cátion ajustado (CA-MHB) desidratado com polimixina B liofilizada em concentrações decrescentes (de 64 a 0,125µg/mL) e os poços 11 e 12 são destinados para o controle de crescimento e controle negativo do teste, respectivamente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	CC	
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	CC	

Figura 3.1 Microplaca de titulação Policimbac® utilizada na determinação da CIM para polimixina B

Para preparo do inóculo, foram utilizados 3 tubos de ensaio. No tubo 1, com auxílio de um turbidímetro (Densicheck, Biomérieux, França), foi preparada uma suspensão bacteriana em solução fisiológica (NaCl 0,9% p/v) equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC/mL). No tubo 2, foi realizada uma diluição de 1:100 (10^6 UFC/mL) em CA-MHB (Becton Dickinson, Alemanha) a partir do tubo 1. No tubo 3, a suspensão bacteriana do tubo 2 foi diluída em 10 vezes em CA-MHB, resultando em um inóculo de 10^5 UFC/mL.

Em seguida, 100 µL dessa última suspensão foram transferidos para os poços da microplaca, que posteriormente foi incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas em estufa bacteriológica. Como controles de qualidade do teste, foram utilizadas as cepas *E. coli* ATCC 25922 (CIM_{polimixina} 0,25 a 2 µg/mL) e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (CIM_{polimixina} 0,5 a 2 µg/mL).

Após o período de incubação, a leitura foi realizada e considerou-se como a CIM o primeiro poço onde não houve crescimento bacteriano.

Para interpretação dos resultados foram considerados os pontos de corte estabelecidos pelo Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST, 2022) (98). Isolados com CIM >2 µg/mL foram categorizados como resistentes às polimixinas e, portanto, mantidos em caldo BHI (Oxoid, UK) acrescido de 2% de glicerol (Sigma-Aldrich, EUA) e criopreservados em nitrogênio líquido até a sua utilização.

Para o presente estudo, foram selecionadas todas as amostras resistentes às polimixinas provenientes das 4 granjas, que se encontravam depositadas no acervo do LabSUR.

3.2 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método da disco-difusão

A susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras incluídas no estudo foi avaliada utilizando-se o teste de difusão em ágar, conforme protocolo preconizado pelo BrCAST (99).

Para realização da técnica, foi preparada uma suspensão bacteriana equivalente a 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC/mL) a partir de crescimento bacteriano recente em meio ágar nutriente (OXOID, Hampshire, UK). Com auxílio de swab estéril, esta suspensão foi semeada em ágar Muller-Hinton (OXOID, Hampshire, UK) de modo a se obter crescimento confluyente. Os discos de antimicrobianos foram aplicados, as placas invertidas e incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 ± 2 h. Para este teste, foram utilizados discos de antimicrobianos utilizados na rotina clínica humana descritos na tabela 3.1.

A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com as recomendações do BrCAST 2022, com exceção do ácido nalidíxico, que por não haver ponto de corte estabelecido pelo BrCAST, foi categorizado de acordo com o documento M100 do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) (100).

Tabela 3.1. Antimicrobianos selecionados para verificação do perfil de suscetibilidade.

Classes	Antimicrobianos	Conteúdo do disco
Aminoglicosídeos	Amicacina Gentamicina	30 µg 10 µg
Anfenicóis	Cloranfenicol	30 µg
Inibidores da via do folato	Sulfametoxazol/trimethoprim	25 µg
Cefalosporinas 2 ^a geração	Cefoxitina Cefuroxima	30 µg 30 µg
Cefalosporinas 3 ^a geração	Ceftazidima Ceftriaxona	10 µg 30 µg
Cefalosporina 4 ^a geração	Cefepime	30 µg
Carbapenemas	Ertapenem Imipenem Meropenem	10 µg 10 µg 10 µg
Glicilciclina	Tigeciclina	15 µg
Monobactâmico	Aztreonam	30 µg
Penicilinas	Ampicilina	10 µg
Quinolonas	Ácido Nalidíxico Ciprofloxacino	30 µg 5 µg
Tetraciclinas	Tetraciclina	30 µg

3.3 Investigação de gene plasmidial envolvido na resistência às polimixinas

Antes de realizar a amplificação dos alvos genômicos, o Ácido Desoxirribonucleico (DNA) total das amostras foi extraído por sonicação. Para isso, uma ou duas colônias obtidas de crescimento recente em ágar nutriente (OXOID, Hampshire, UK) foram suspensas em microtubo de polipropileno de 1,5 mL contendo 500 µL de água ultrapura (Invitrogen, EUA). A suspensão foi agitada em vórtex e, em seguida, submetida à sonicação em cuba de ultrassom (Cristófoli, Paraná, Brasil) por 30 segundos por três vezes. A suspensão bacteriana foi homogeneizada no intervalo entre as sonicações. A amostra foi em seguida centrifugada em microcentrífuga (Heraeus® Biofuge Fresco) a 13.000 xg por três minutos, e o sobrenadante contendo

o DNA foi transferido para outro microtubo de polipropileno de 1,5 mL e mantido a -20°C até a sua utilização.

As variantes (*mcr-1* ao 9) do gene plasmidial de resistência à colistina foram pesquisadas através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em todas as amostras incluídas no estudo, utilizando os iniciadores descritos na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Iniciadores usados para detecção dos genes plasmidiais de resistência à polimixina.

Genes	Sequencias dos iniciadores (5'-3')	tamanhos dos produtos (pb)	Referência
<i>mcr-1</i>	F AGTCCGTTTGTTCCTTGTGGC R AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	320	(101)
<i>mcr-2</i>	F CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT R TCTAGCCCGACAAGCATAACC	715	(101)
<i>mcr-3</i>	F AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG R AATGGAGATCCCCGTTTTT	929	(101)
<i>mcr-4</i>	F TCACTTTCATCACTGCGTTG R TTGGTCCATGACTACCAATG	1.116	(101)
<i>mcr-5</i>	F ATGCGGTTGTCTGCATTTATC R TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG	1.614	(101)
<i>mcr-6</i>	F GTCCGGTCAATCCCTATCTGT R ATCACGGGATTGACATAGCTAC	252	(102)
<i>mcr-7</i>	F TGCTCAAGCCCTTCTTTTCGT R TTCATCTGCGCCACCTCGT	551	(102)
<i>mcr-8</i>	F AACCGCCAGAGCACAGAATT R TTCCCCCAGCGATTCTCCAT	856	(102)
<i>mcr-9</i>	F GTATCCTTCCTGCCATCCTC R CTTTCCATAACAGCGAGACAC	1.011	(102)

Para isso, duas reações de PCR “multiplex” (*mcr-1-5* e *mcr-6-9*) foram preparadas em um volume final de 25 µL. Na reação de amplificação para os genes *mcr-1-5* havia 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega, EUA), 0,25 µL dos iniciadores F e R de cada gene a uma concentração de 20 pmoles/µL, 8 µL de água para PCR ultrapura (Invitrogen, EUA) e 2 µL de DNA cromossômico. Para os genes *mcr-6-9* foi preparada uma reação contendo 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega, EUA), 0,25

μL de cada iniciador (20 pmoles/μL), 8,5 μL de água ultrapura (Invitrogen, EUA) e 2 μL de DNA cromossômico.

As condições de amplificação para ambas as reações foram: 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 15 minutos, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 35 segundos, anelamento a 58°C por 90 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. Por fim, uma extensão final de 72°C por 10 minutos foi realizada. Como controles, foram utilizadas as cepas CCBH20180 (*mcr-1*-positiva), CCBH35182 (*mcr-2*-positiva), CCBH35183 (*mcr-3*-positiva), CCBH35184 (*mcr-4*-positiva), CCBH25606 (*mcr-5*-positiva), CCBH35185 (*mcr-6*-positiva) e CCBH27304 (*mcr-9*-positiva).

Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) em TBE 0,4X (EDTA 0,5M pH 8,0; Tris 1M pH 8,0; Ácido Bórico 0,035M). A corrida eletroforética foi realizada em TBE 0,4X sob corrente de 100V, por 30 minutos. Em seguida, o gel foi corado em GelRed Biotium (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) diluído em tampão TBE 1X e posteriormente visualizados e fotografados sob luz ultravioleta usando o fotodocumentador L-Pix EX (Loccus Biotecnologia).

3.4 Tipagem genotípica por eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (“Pulsed-Field Gel Electrophoresis” – PGFE)

Todos os isolados de *E. coli* foram submetidos à tipagem molecular por PFGE, utilizando-se a enzima de restrição *Xba*I, de acordo com o protocolo descrito por Ribot e colaboradores, com adaptações (103).

Os isolados foram semeados em tubos contendo ágar nutriente (OXOID, Hampshire, UK) inclinado e incubados por 24 horas a 35°C ± 2 em estufa bacteriológica. Após a incubação, foi preparada uma suspensão bacteriana em tampão de suspensão de células (BSC; Tris 100 mM, EDTA 100 mM [pH 8,0]) correspondente ao padrão 3 de McFarland. Uma alíquota de 200 μL dessa suspensão foi transferida para um microtubo de polipropileno contendo 5μL de Proteinase K (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 50mg/μL. Em seguida, 200 μL de agarose Seakem® Gold (Lonza, Atlanta, EUA) a 1% (0,1 g de agarose; 0,5 mL de SDS 1%; 9,4 mL de Tris-EDTA [Tris 10 mM, EDTA 1mM [pH 8.0]]) foram adicionados à suspensão de

células, homogeneizados e distribuídos em moldes para blocos de PFGE (Bio-Rad, Berkeley, EUA). Os blocos solidificados foram transferidos para tubos de polipropileno de 15 mL, contendo 5µL de Proteinase K (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 50mg/µL e 2 mL de solução de lise (Tris 50 mM, EDTA 50 mM [pH 8,0], 1% Sarcosyl [Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA]) e incubados em banho-maria a 50°C por 2 horas. Após a incubação, os blocos foram lavados 3 vezes com água Milli-Q estéril a 50°C por 15 minutos e uma vez com tampão TE a 50°C por 15 minutos. Posteriormente, os blocos foram mantidos em 2mL de tampão TE na geladeira.

Para a etapa de digestão enzimática, aproximadamente um terço dos blocos foram cortados e transferidos para microtubos de polipropileno contendo 5 µL do tampão da enzima *Xba*I (Thermo Scientific, Lituânia) e 45 µL de água MilliQ, onde permaneceram por 30 minutos a 4°C. Em seguida, os blocos foram colocados em um mix com volume final de 50 µL, contendo 44 µL de água MilliQ, 5 µL do tampão da enzima e 1 µL da enzima de restrição *Xba*I (Thermo Scientific, Lituânia) por 3 horas a 37 °C.

A separação dos fragmentos de restrição foi realizada em gel de agarose 1,1% Seakem® Gold (Lonza, Atlanta, EUA) preparado em TBE 0,4X, utilizando o sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, Richmond, EUA), sob as condições a seguir: tempo de pulso crescente de 0,5 segundos (inicial) a 35 segundos (final), por 17 horas a 6V/cm, na temperatura de 14°C, em TBE 0,4X. Foi utilizado o Lambda PFG Ladder (50 ug/mL - New England BioLabs, Ipswich, MA) como marcador de peso molecular nas corridas eletroforéticas.

Após as corridas, os géis foram corados em GelRed Biotium (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por 20 minutos, posteriormente visualizados sob luz ultravioleta e fotografados, utilizando-se o fotodocumentador L-Pix EX (Loccus Biotecnologia).

A análise dos géis e confecção de dendrogramas foram realizadas através do "software" BioNumerics 6.6 (Applied Maths). Os agrupamentos foram realizados utilizando o coeficiente de *Dice*, e os valores de otimização e tolerância de 1,5%. Os isolados com percentual de similaridade acima de 80% foram considerados pertencentes ao mesmo grupo clonal.

3.5 Avaliação da transferência de genes de resistência às polimixinas

A avaliação da capacidade de transferência plasmidial foi realizada através de ensaio de conjugação, utilizando a cepa *Escherichia coli* J53 como receptora, cepa intrinsecamente resistente à azida sódica. Como doadoras, foram selecionadas amostras com perfis fenotípicos e genotípicos diferentes.

Para realização do experimento, as cepas doadoras e a receptora foram inoculadas em tubos contendo 2 mL de caldo BHI (Oxoid, Hampshire, UK) e incubadas por 3 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ em agitador orbital (Marshall Scientific, EUA) a 150 rpm. Após esse período, 600 μL da cepa receptora e 400 μL da doadora foram transferidos para um tubo estéril, sendo colocadas em co-cultura, e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ em agitador orbital a 150 rpm, por 3 horas.

Objetivando selecionar a cepa receptora (resistente à azida sódica e resistente à colistina) e inibir o crescimento da cepa doadora (sensível à azida sódica), 100 μL de cada co-cultura foram semeados por espalhamento em meio ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, UK) suplementado com 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de colistina (Sigma-Aldrich, EUA) e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de azida sódica (Sigma-Aldrich, EUA). Os meios foram incubados em estufa bacteriológica por 24 horas a $35^\circ\text{C} \pm 2$.

Posteriormente, o crescimento no meio seletivo foi avaliado e para confirmação da presença de transconjugantes foram realizados PCR para detecção de gene *mcr*, conforme descrito no item 3.4, a CIM para polimixina foi determinada de acordo com item 3.2, seguido do PFGE, utilizando a enzima S1-nuclease para a avaliação do peso molecular do plasmídeo conjugado (descrito adiante). Além disso, a espécie da transconjugante foi identificada por MALDI-TOF MS.

3.5.1 PFGE utilizando S1-nuclease

A confirmação da passagem de plasmídeos para cepa receptora e verificação do peso molecular desses plasmídeos foram realizadas por meio da metodologia de S1 nuclease. Nessa técnica, foi feita a mesma extração de DNA total descrita no tópico 3.4 (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado - PFGE), seguida da digestão enzimática pela enzima S1-nuclease (2 unidades), por 45 minutos (104).

Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 1,1% Seakem® Gold (Lonza, Atlanta, EUA) preparado em TBE 0,4X, utilizando o sistema

CHEF-DRIII (Bio-Rad, Richmond, EUA). As condições utilizadas foram: tempo de pulso crescente de 0,5 segundos (inicial) a 35 segundos (final), por 14 horas a 6V/cm, na temperatura de 14°C, em TBE 0,4X. Foi utilizado como marcador de peso molecular o Lambda PFG Ladder (50 ug/mL - New England BioLabs, Ipswich, MA).

Após as corridas, os géis foram corados em GelRed Biotium (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por 20 minutos, posteriormente visualizados sob luz ultravioleta e fotografados, utilizando-se o fotodocumentador L-Pix EX (Loccus Biotecnologia).

4 RESULTADOS

4.1 Triagem de amostras resistentes às polimixinas

Entre o período de julho de 2019 e março de 2020, foram coletados um total de 202 “swabs” de cloaca em 3 estabelecimentos de frangos comerciais de corte e 1 granja de postura caipira localizadas em São José do Vale do Rio Preto, no estado do Rio de Janeiro (figura 4.1). No período, foram realizadas 2 visitas nas granjas de aves de corte e 1 visita na granja de postura caipira.



Figura 4.1 Mapa de localização das 4 granjas, distribuídas em São José do Vale do Rio Preto, no estado do Rio de Janeiro. Nota: Os pontos em vermelho representam as granjas onde as coletas foram realizadas. As granjas 1,2 e 3 correspondem aos estabelecimentos de frangos de corte e a granja 4, a de postura caipira.

No total, 125 amostras bacterianas apresentaram crescimento em ágar EMB suplementado com 4 μ g/mL de sulfato de colistina. Destas, 45,6% (57/125) eram oriundas da granja 1, 23,2% (29/125) da granja 2, 28% (35/125) da granja 3 e 3,2% (4/125) da granja 4 (figura 4.2).

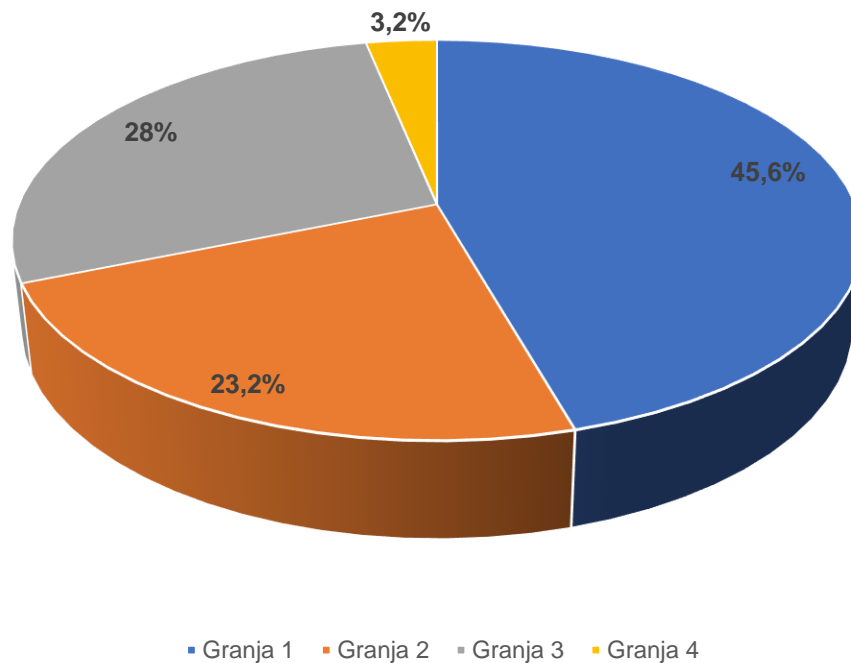


Figura 4.2. Distribuição por granja das amostras que apresentaram crescimento em meio EMB. As granjas 1,2 e 3 correspondem aos estabelecimentos de frangos de corte e a granja 4, a de postura caipira.

4.1.1 Identificação das espécies bacterianas

A identificação dos 125 isolados foi realizada por MALDI-TOF MS, com boa pontuação (2.21-2.59), sendo 99% (124/125) das amostras identificadas como *Escherichia coli* e 1% (1/125) identificada como *Klebsiella pneumoniae*.

4.1.2 Frequência de resistência às polimixinas

Do total de amostras obtidas no meio EMB suplementado com 4µg/mL de sulfato de colistina (125), 69,6% (n= 87) foram consideradas resistentes à polimixina B no método da microdiluição em caldo, e foram, portanto, incluídas definitivamente no estudo. Destas, 86 eram da espécie *Escherichia coli* e 1 da espécie *Klebsiella pneumoniae*.

As 87 amostras apresentaram CIMs que variaram de 8 µg/mL a 64 µg/mL. As CIM₅₀ e CIM₉₀, que indicam a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 50% e 90% dos isolados, foram 16 µg/mL e 32 µg/mL, respectivamente, conforme figura 4.3.

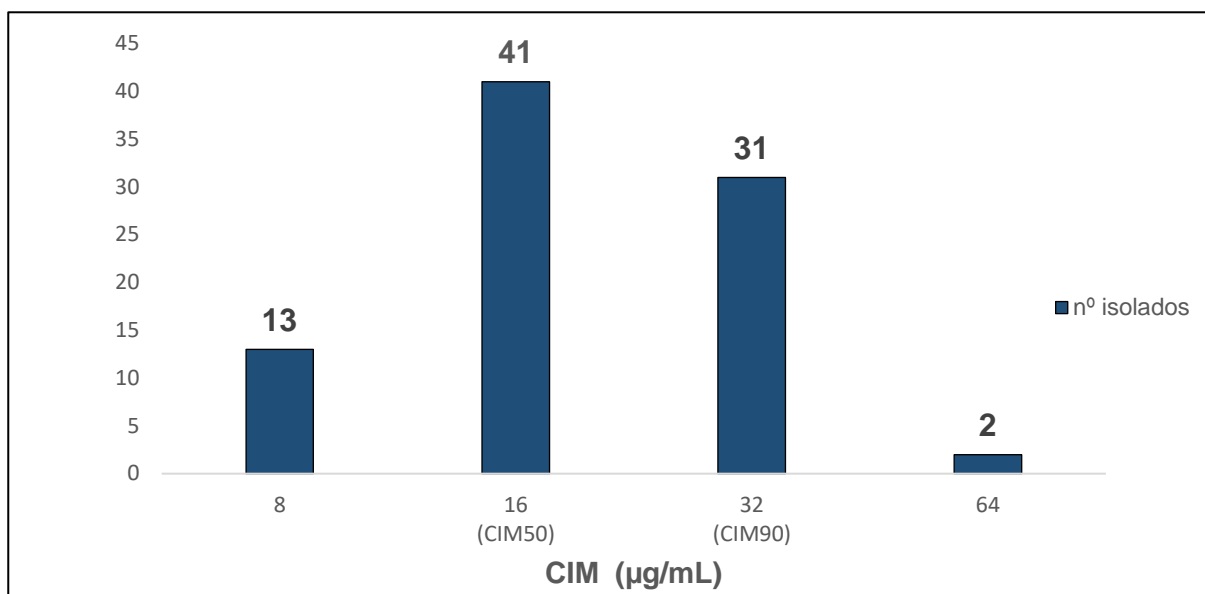


Figura 4.3. Variação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de polimixina nas 87 amostras selecionadas para o estudo.

Estratificando os resultados da triagem por granja e ainda considerando o total de amostras obtidas no meio EMB, observou-se uma frequência de 38,6% de resistência à polimixina nas amostras oriundas da granja 1, 100% nas da granja 2, 91,4% nas da granja 3 e 100% nas da granja 4, conforme tabela 4.1.

Tabela 4.1. Determinação da frequência de resistência à polimixina por granja

	Total de isolados ^a	Nº resistentes ^b	%
Granja 1	57	22	38,6%
Granja 2	29	29	100%
Granja 3	35	32	91,4%
Granja 4	4	4	100%

^a Amostras que apresentaram crescimento em EMB contendo 4 µg/mL de polimixina.

^b Amostras resistentes à polimixina - CIM polimixina > 2 µg /mL, determinada por microdiluição em caldo.

4.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (difusão em ágar)

Foram testados 18 antimicrobianos de diferentes classes farmacológicas utilizadas na prática clínica humana pela técnica de disco difusão. As maiores taxas de resistência apresentadas foram para o ácido nalidíxico (60,9%) e tetraciclina

(58,6%). As menores taxas de resistência foram observadas para a cefoxitina (1,2%), tigeciclina (3,4%) e cloranfenicol (5,7%) e nenhum dos isolados apresentou resistência ao imipenem e meropenem. Para os demais antimicrobianos as taxas de resistência variaram de 38 a 10% (Figura 4.4).

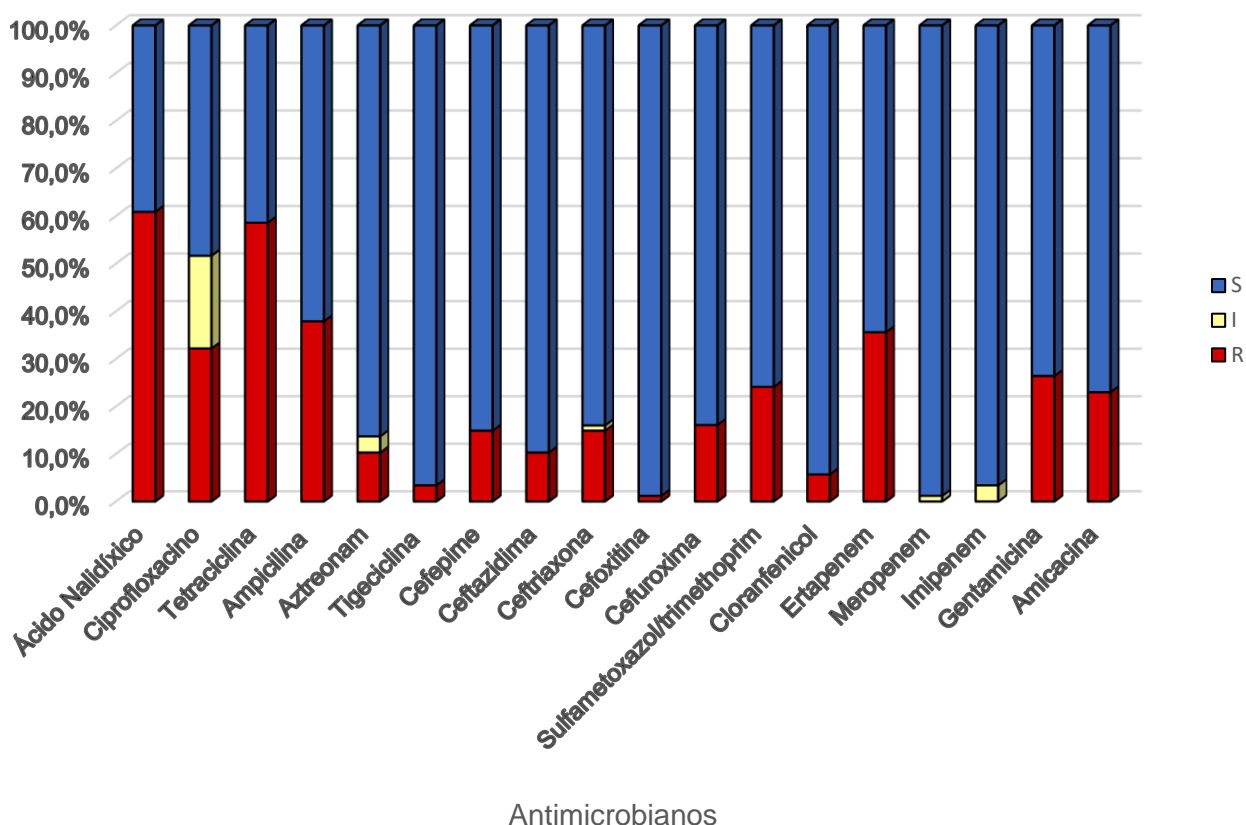


Figura 4.4 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 87 amostras resistentes à polimixina. Legenda: R= Resistente; I= Sensível aumentando exposição; S= Sensível.

4.2.1 Análise dos perfis de multirresistência

De acordo com os conceitos de multirresistência estabelecidos por Magiorakos e colaboradores (2012) (7), 75% (66/87) dos isolados selecionados foram considerados MDR (“Multidrug-Resistant”), ou seja, não foram susceptíveis a pelo menos um representante de três ou mais classes de antimicrobianos.

Diante da classificação proposta, foram determinados 36 perfis de multirresistência, sendo os mais frequentes os perfis P27 (n=6), P32 (n=6), P33 (n=6), conforme pode ser observado na tabela 4.2.

Todos os 66 isolados MDR eram da espécie *E. coli*. Destes, 27,3% eram provenientes da granja 1, 36,3% da granja 2, 34,9% da granja 3 e 1,5% da granja 4.

Dos 66 isolados de *E. coli* MDR, 34,8% apresentaram resistência a três classes de antibióticos, 36,4% a quatro classes, 12,1% foram resistentes a cinco classes, 6,1% a seis classes, 6,1% apresentaram resistência a sete classes e 4,5% foram resistentes a oito classes de antimicrobianos.

Tabela 4.2. Perfis de multirresistência determinados para 66 isolados de *E. coli*.

Perfil	Nº de classes não susceptíveis	Classes/Categorias não susceptíveis	<i>E. coli</i>, polimixina-R n
P1	8	PEN/ AMG/ CEF/ TET/ ANF/ IVF/ MON/ POL	1
P2	8	PEN/ AMG/ CEF/ TET/GLI/ IVF/MON/ POL	1
P3	8	PEN/ AMG/ QUI/ TET/ ANF/ IVF/ CARB/ POL	1
P4	7	PEN/ CEF/ QUI/ TET/ IVF/ CARB/ POL	2
P5	7	PEN/ AMG/ CEF/ IVF/ MON/ CARB/ POL	1
P6	7	PEN/ AMG/ CEF/ TET/ IVF/ MON/ POL	1
P7	6	PEN/ AMG/CEF/ TET/ MON/ POL	1
P8	6	PEN/ AMG/ CEF/ IVF/ MON/ POL	1
P9	6	PEN/ AMG/ QUI/ TET/ CARB/ POL	1
P10	6	PEN/ AMG/ QUI/ IVF/ ANF/ POL	1
P11	5	PEN/ AMG/ CEF/ MON/ POL	1
P12	5	PEN/ AMG/ CEF/ TET/ POL	2
P13	5	PEN/ AMG/ TET/ ANF/ POL	1
P14	5	PEN/ QUI/ GLI/ IVF/ POL	1
P15	5	PEN/ AMG/ TET/ CARB/ POL	1
P16	5	AMG/ QUI/ TET/ CARB/ POL	1
P17	5	PEN/ AMG/ CEF/ TET/ POL	1
P18	4	PEN/ CEF/ MON/ POL	2
P19	4	PEN/ AMG/ TET/ POL	1
P20	4	TET/ IVF/ AMG/ POL	1
P21	4	TET/ AMG/ CARB/ POL	1
P22	4	AMG/ QUI/ CARB/ POL	2
P23	4	PEN/ TET/ CARB/ POL	1
P24	4	AMG/ IVF/ TET/ POL	4
P25	4	PEN/ QUI/ TET/ POL	2
P26	4	AMG/ IVF/ CARB/ POL	2
P27	4	QUI/ TET/ CARB/ POL	6
P28	4	QUI/ TET/ ANF/ POL	1
P29	4	AMG/ TET/ CARB/ POL	1
P30	3	AMG/ TET/ POL	2
P31	3	PEN/ AMG/ POL	1
P32	3	PEN/ TET/ POL	6
P33	3	QUI/ CARB/ POL	6

Perfil	Nº de classes não susceptíveis	Classes/Categorias não susceptíveis	<i>E. coli</i> , polimixina-R n
P34	3	TET/ CARB/ POL	1
P35	3	TET/ IVF/ POL	3
P36	3	TET/QUI/ POL	4

Legenda: AMG= Aminoglicosídeos; ANF= Anfencóis; CARB= Carbapenemas; CEF= Cefalosporinas; GLI= Gliciliciclina; IVF= Inibidores da via do folato; MON= Monobactâmicos; PEN= Penicilinas; POL= Polimixinas; QUI= Quinolonas; TET= Tetraciclinas.

4.3 Detecção de gene plasmidial envolvido na resistência às polimixinas

A investigação da presença das variantes alélicas (*mcr-1* a *mcr-9*) do gene plasmidial foi realizada nas amostras de *E. coli* (n=86) e no único isolado de *K. pneumoniae* selecionados para este estudo.

Para *E. coli*, foram identificadas 85 amostras carreadoras do gene *mcr-1* e 1 amostra portadora do gene *mcr-5*. As amostras de *E. coli* produtoras de MCR-1 apresentaram fenótipo de resistência, com CIM_{polimixina} entre 8 e 64 µg/mL. Do mesmo modo, a *E. coli* produtora de MCR-5 apresentou resistência, com CIM_{polimixina}= 32 µg/mL. As variantes *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8* e *mcr-9* não foram detectadas nos isolados dessa espécie.

Em relação a *K. pneumoniae*, o isolado foi positivo para o gene *mcr-1*. A CIM de polimixina para esta amostra produtora de MCR-1 foi 64 µg/mL. As demais variantes pesquisadas não foram identificadas.

Considerando as duas espécies, a frequência do gene *mcr-1* nas amostras estudadas foi 99% (86/87) e do *mcr-5*, 1% (1/87).

4.4 Avaliação da transferência de genes de resistência às polimixinas

Para realização de ensaio de conjugação, foram utilizadas como cepas doadoras as amostras 2A (*E. coli*) e 11F (*K. pneumoniae*), ambas portadoras do gene *mcr-1*. Como receptora, foi utilizada a cepa *E. coli* J53, resistente à azida sódica.

As CIMs de polimixina determinadas por microdiluição em caldo para as amostras doadoras 2A e 11F foram 32 µg/mL e 64 µg/mL, respectivamente. A cepa *E. coli* J53 apresentou $CIM_{polimixina} = 0,25 \mu\text{g/mL}$.

A seleção em meio contendo azida sódica e sulfato colistina permitiu a obtenção de dois transconjugantes, que foram denominados T-2A-*mcr* e T-11F-*mcr*. Ambos foram identificados como *E. coli*, carregavam o gene *mcr-1* e apresentaram aumento na CIM, de 0,25 µg/mL para 32 µg/mL. Além disso, a transferência de um único plasmídeo de ~194 Kb para T-2A-*mcr* e um de ~48.5 Kb para T-11F-*mcr* foi confirmada por PFGE, utilizando a enzima S1-nuclease (Figura 4.5).

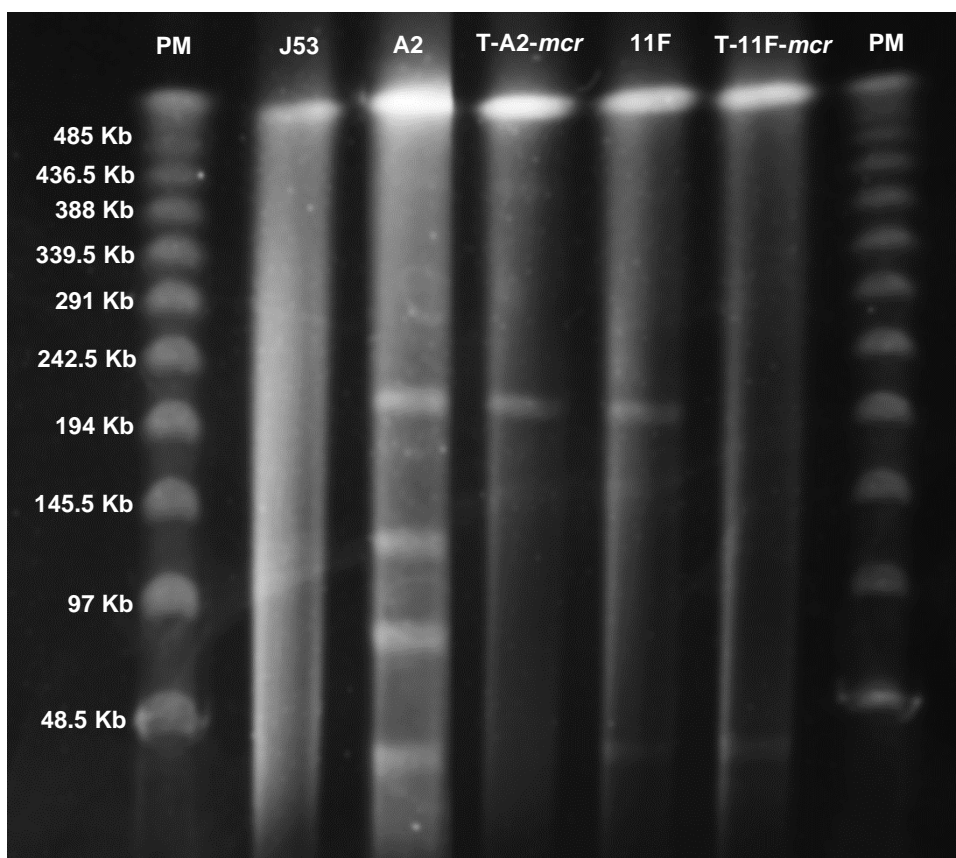


Figura 4.5 Foto de gel obtido por PFGE, utilizando a enzima S1-nuclease.
Legenda: PM = padrão molecular Lambda Ladder

4.5 Avaliação da diversidade genética através de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

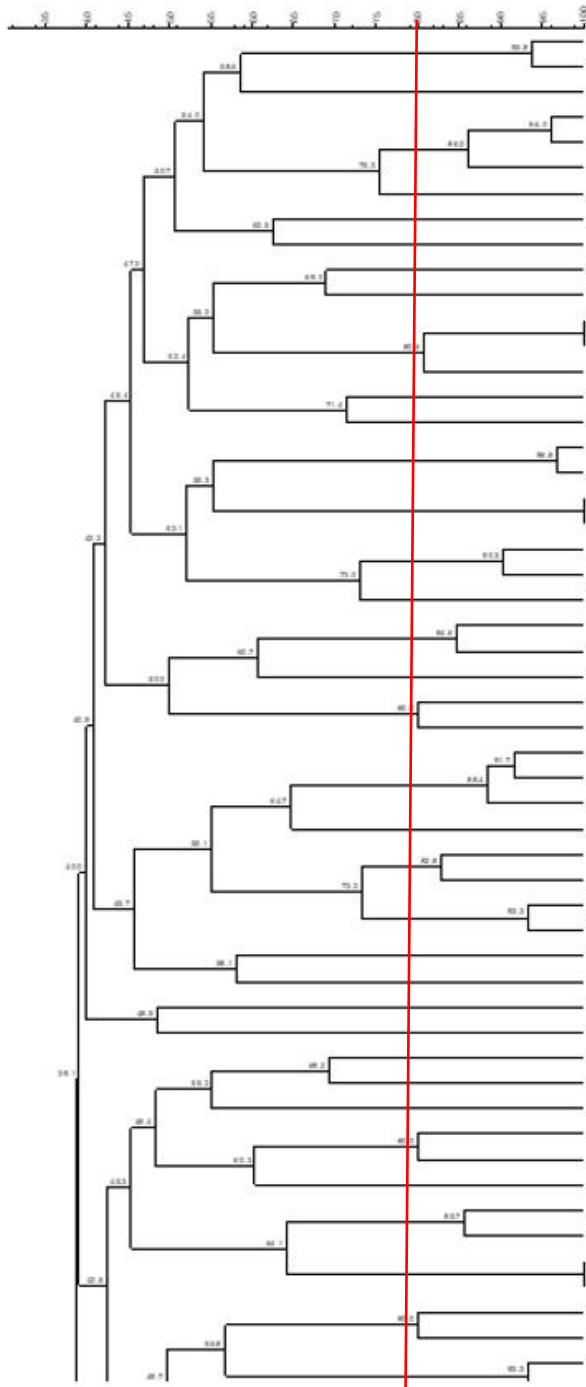
A análise dos fragmentos de restrição de DNA dos 86 isolados de *E. coli* mostrou 59 grupos clonais diferentes (Ec1 a Ec59), determinados de acordo com 80% de similaridade e utilizando o coeficiente de Dice (figura 4.6).

Foi possível observar uma grande diversidade genética entre as amostras estudadas. Um total de 35 amostras apresentou perfil de fragmentação único, correspondendo a 40,7%. 5 grupos clonais foram compostos por apenas 3 isolados e 18 por 2 isolados.

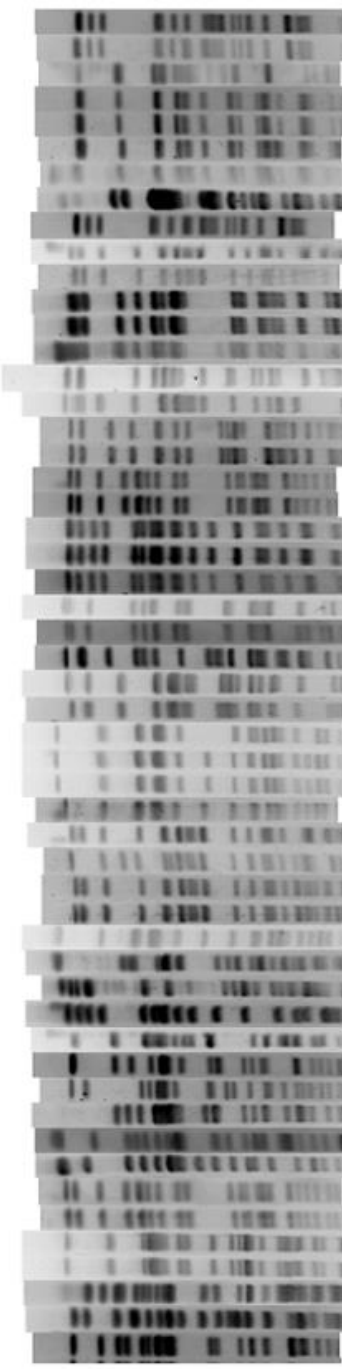
O maior número de grupos clonais foi encontrado entre as amostras provenientes da granja 2 (24 grupos em 29 amostras). Seguido da granja 3, onde foram identificados 22 grupos em 32 amostras. A granja 1 apresentou 14 grupos em 22 amostras e a granja 4, 3 grupos em 4 amostras.

Cabe destacar que 4 grupos clonais foram identificados em mais de uma granja. Destes, Ec3 e Ec18 foram identificados nas granjas 2 e 3. Ec21 foi encontrado nas granjas 1 e 2 e Ec34 nas granjas 1 e 3.

PFGE



PFGE



Amostra	Grupo clonal	Granja	Gene
71.1	Ec1	3	<i>mcr-1</i>
11I	Ec1	3	<i>mcr-1</i>
12I.2	Ec2	3	<i>mcr-1</i>
6I	Ec3	3	<i>mcr-1</i>
8I	Ec3	3	<i>mcr-1</i>
12E	Ec3	2	<i>mcr-1</i>
15I	Ec4	3	<i>mcr-1</i>
18C	Ec5	1	<i>mcr-1</i>
1I	Ec6	3	<i>mcr-1</i>
19F	Ec7	1	<i>mcr-1</i>
11E	Ec8	2	<i>mcr-1</i>
3C	Ec9	1	<i>mcr-1</i>
5C	Ec9	1	<i>mcr-1</i>
11C	Ec9	1	<i>mcr-1</i>
8J	Ec10	1	<i>mcr-1</i>
7E.1	Ec11	2	<i>mcr-1</i>
14E	Ec12	2	<i>mcr-1</i>
15E	Ec12	2	<i>mcr-1</i>
21.1	Ec13	3	<i>mcr-1</i>
9I	Ec13	3	<i>mcr-1</i>
11G	Ec14	3	<i>mcr-1</i>
13G	Ec14	3	<i>mcr-1</i>
10G	Ec15	3	<i>mcr-1</i>
2E	Ec16	2	<i>mcr-1</i>
20E.2	Ec16	2	<i>mcr-1</i>
10I.1	Ec17	3	<i>mcr-1</i>
6E.2	Ec18	2	<i>mcr-1</i>
7G.1	Ec18	3	<i>mcr-1</i>
9E	Ec19	2	<i>mcr-1</i>
10E.1	Ec19	2	<i>mcr-1</i>
8E.2	Ec19	2	<i>mcr-1</i>
10E.2	Ec20	2	<i>mcr-1</i>
1F	Ec21	1	<i>mcr-1</i>
19E	Ec21	2	<i>mcr-1</i>
17E.1	Ec22	2	<i>mcr-1</i>
18E.1	Ec22	2	<i>mcr-1</i>
1E	Ec23	2	<i>mcr-1</i>
4G.2	Ec24	3	<i>mcr-1</i>
17E.2	Ec25	2	<i>mcr-1</i>
14G.1	Ec26	3	<i>mcr-1</i>
12F	Ec27	1	<i>mcr-1</i>
5I	Ec28	3	<i>mcr-1</i>
16E.1	Ec29	2	<i>mcr-1</i>
1C	Ec30	1	<i>mcr-1</i>
17F	Ec30	1	<i>mcr-1</i>
16C	Ec31	1	<i>mcr-1</i>
13I.1	Ec32	3	<i>mcr-1</i>
16I	Ec32	3	<i>mcr-1</i>
7E.2	Ec33	2	<i>mcr-1</i>
8E.1	Ec33	2	<i>mcr-1</i>
2A	Ec34	1	<i>mcr-1</i>
14G.2	Ec34	3	<i>mcr-1</i>
3I	Ec35	3	<i>mcr-1</i>

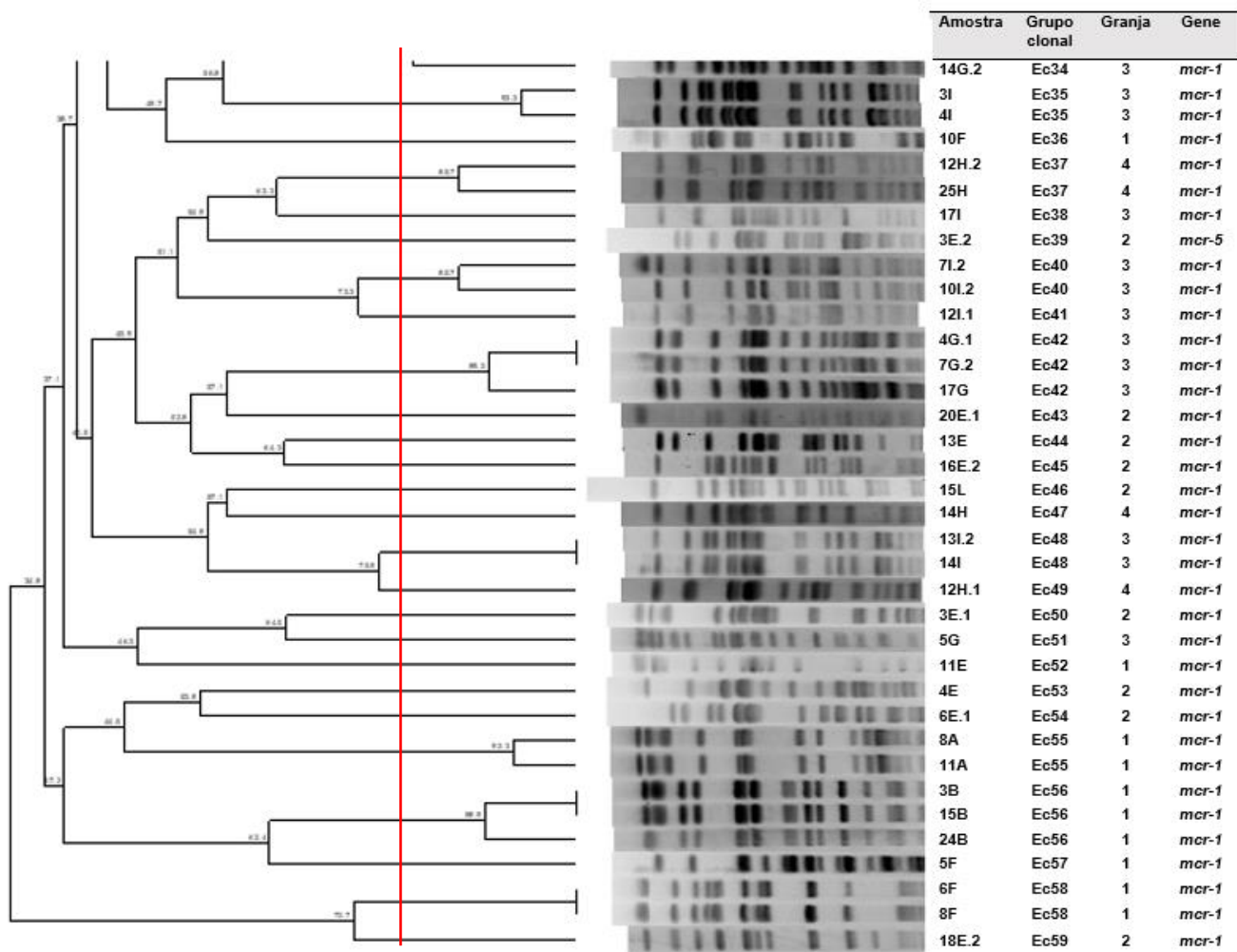


Figura 4.6: Dendrograma mostrando os perfis de fragmentação do DNA encontrados nas 86 amostras de *E. coli* resistentes às polimixinas. Nota: Linha vermelha indicando 80% de similaridade.

5 DISCUSSÃO

Atualmente, as polimixinas são classificadas pela OMS como um dos antimicrobianos de maior prioridade na medicina humana, pois cumprem os critérios de serem uma das poucas terapias disponíveis para tratamento de infecções bacterianas graves (critério 1) e por serem utilizadas para tratar infecções causadas por bactérias adquiridas de fontes não humanas ou que podem adquirir genes de resistências dessas fontes (critério 2) (105). No entanto, com o amplo uso desses antimicrobianos em animais de produção e com o retorno da sua utilização na prática clínica humana, principalmente no tratamento de infecções por bactérias produtoras de carbapenemases, tem sido observado nos últimos anos um aumento da resistência a essas drogas, o que é uma questão de grande preocupação (106).

Conforme mencionado anteriormente, a resistência às polimixinas pode ser causada por mutações cromossômicas ou genes plasmidiais, sendo este último de mais fácil propagação. Após a primeira identificação do gene mobilizável de resistência à colistina *mcr-1* por Liu e colaboradores em 2015 (84), a comunidade científica voltou sua atenção para a resistência às polimixinas, em virtude do potencial de disseminação desse gene plasmidial e a necessidade crescente de manter a eficácia da colistina no tratamento de infecções multirresistentes em humanos.

A descoberta de determinantes genéticos móveis de resistência à colistina em animais de produção renovou a atenção para os riscos potenciais do uso generalizado de antimicrobianos na pecuária. Diante desse cenário, o uso de colistina na medicina veterinária foi reconsiderado em todo o mundo. No Brasil, a sua utilização como promotor de crescimento na pecuária foi proibida pelo MAPA em novembro de 2016, seguindo as recomendações internacionais da OMS, no entanto a colistina ainda pode ser utilizada terapêuticamente em animais (68).

Os dados obtidos no presente estudo evidenciaram alta taxa de resistência à polimixina (69,6%) em amostras isoladas de frangos no período de 2019 a 2020, no estado do Rio de Janeiro (Brasil). Um estudo realizado por Fernandes e colaboradores (2016) descreveu uma taxa de resistência de 40% em amostras isoladas de frangos de corte de diferentes estados do Brasil, obtidas nos anos 2003 a 2015 (107). Outro estudo com 107 amostras de *E. coli* isoladas de três granjas no estado do Rio de

Janeiro encontrou uma taxa de resistência à colistina de 95,33%, no período de 2015 a 2016 (108). Assim, nossos dados podem sugerir que a resistência às polimixinas em amostras isoladas de frangos continua a persistir no Brasil, mesmo após o banimento desse antibiótico como promotor de crescimento.

Assim como em nosso trabalho, outros autores encontraram altas taxas de resistência à colistina em aves. Um estudo conduzido na China objetivou avaliar a resistência à colistina em 78 amostras de *E. coli* isoladas de frangos com sinais de diarreia em uma granja, obtidas no ano de 2015. Nessa ocasião, os autores identificaram uma taxa de resistência de 73,1% (109). Em 2018, Azizpour e colaboradores realizaram um estudo com 178 isolados de *E. coli* provenientes de frangos de corte com sinais clínicos de colibacilose no Irã e a frequência de resistência à colistina relatada pelos autores foi 60,1% (110).

Com o objetivo de elucidar os mecanismos genéticos que determinam a resistência às polimixinas, a presença das variantes do gene plasmidial foi investigada em nossas amostras. O gene *mcr-1* foi o mais prevalente, identificado em 99% (86/87) dos isolados, e por sua vez, o gene *mcr-5* foi identificado em menor proporção, presente em apenas 1 amostra, corroborando com os dados descritos até o momento, como por exemplo o estudo de Valiakos e colaboradores (2021), no qual aponta uma maior prevalência do gene *mcr-1* em amostras isoladas de frangos em comparação com as demais variantes (85).

Um estudo conduzido por Barbieri e colaboradores (2021) detectou o *mcr-1* em 57,9% em *E. coli* de origem aviária coletadas em granjas da região serrana do Rio de Janeiro, nos anos 2015 e 2016. A variante *mcr-5* foi identificada em 2,8% dos isolados. Contudo, 35% das amostras apresentaram resistência fenotípica à colistina sem confirmação da presença de gene *mcr* (108). Esse resultado difere do encontrado em nosso estudo, onde todos os isolados com fenótipo de resistência à polimixina eram portadores de genes da família MCR.

A alta prevalência do gene *mcr* em nossas amostras chama atenção para a possibilidade de disseminação silenciosa da resistência à colistina mediada por plasmídeo entre as amostras isoladas de frangos de corte e postura no Rio de Janeiro, pois as amostras positivas para *mcr-1* e *mcr-5* foram isoladas em quatro diferentes granjas nos anos de 2019 e 2020. Além disso, nossos dados reforçam o papel alarmante desses animais como potenciais reservatórios para o gene *mcr*, o que é um

motivo de preocupação em relação a saúde pública e disseminação desse gene, uma vez que o Brasil é o segundo maior produtor e o maior exportador mundial de carne de frango, e esses determinantes genéticos de resistência à colistina podem ser transmitidos para humanos por contato direto e/ou contaminação da cadeia alimentar (46).

A ocorrência de transmissão cruzada de microrganismos portadores do gene *mcr* entre humanos e frangos já foi observada. Budel e colaboradores (2020) avaliaram a diversidade genética entre Enterobacteriaceae resistentes às cefalosporinas e colistina obtidas de aves, carne de frango e pessoas da comunidade, na Ilha de Zanzibar, Tanzânia. Os resultados demonstraram que havia relação de clonalidade entre os isolados obtidos de pessoas saudáveis, de aves domésticas e de carne de frango. Entre os clones que foram concomitantemente encontrados em humanos e em amostras de origem aviária estava uma *E. coli* portadora de *mcr-1* (111). Além disso, diversos estudos já relataram a detecção de *mcr* em carne e carcaças de frango. Dentre eles, um trabalho realizado por Vasconcelos e colaboradores (2020) identificou uma cepa de *E. coli* ST359 fenotipicamente resistente à colistina que foi recuperada de carcaças de frango de um mercado público no nordeste do Brasil. Essa cepa apresentou o gene *mcr-1* em um plasmídeo do tipo IncX4, que já foi identificado como um vetor chave para a disseminação global do gene *mcr* entre Enterobacteriaceae (112). No Japão, Chiba e colaboradores (2019) detectaram um isolado de *E. coli* abrigando o gene *mcr-1* em carne de frango que havia sido importada do Brasil (113).

Cabe ressaltar que, mais recentemente, estudos realizados em nosso laboratório resultaram na primeira detecção do gene *mcr-1* em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* KPC positivos pertencentes ao ST392, reforçando a capacidade de disseminação desse gene para amostras humanas (114).

No presente trabalho, 99% dos isolados portadores do gene mobilizável de resistência às polimixinas foram identificadas como *E. coli* e apenas 1 amostra foi identificada como *K. pneumoniae*, em consonância com os dados encontrados na literatura. Uma revisão realizada por Luo e colaboradores (2020) evidenciou que *E. coli* foi a espécie mais prevalente entre os isolados positivos para *mcr* relatados até o momento, tanto em isolados de animais quanto em humanos, correspondendo a aproximadamente 90% do total de isolados positivos para *mcr* (115).

Baixas taxas de prevalência de genes *mcr* em *K. pneumoniae* foram relatadas em vários estudos, embora *K. pneumoniae* tenha sido uma das espécies iniciais em que o *mcr-1* foi detectado (115). Um estudo realizado por Nang e colaboradores (2018) pode explicar o motivo dessa baixa prevalência. Os autores investigaram o impacto da aquisição de *mcr-1* no “fitness” dessa espécie, onde observaram que, apesar do *mcr-1* conferir um nível moderado de resistência às polimixinas, a manutenção do plasmídeo carreador do gene estava associada a um custo significativo do “fitness” em *K. pneumoniae* (116).

Embora a utilização de antimicrobianos pertencentes as classes das quinolonas e tetraciclina como aditivos melhoradores de desempenho em animais tenha sido proibida em 2009 no território brasileiro (65), níveis consideráveis de resistência foram encontrados em nossas amostras para o ácido nalidíxico (60,9%), bem como para tetraciclina (58,6%).

Um estudo realizado no Paraná (Brasil) em amostras isoladas de frangos de corte de criação intensiva descreveu uma taxa de resistência para o ácido nalidíxico (62%) semelhante a encontrada em nosso estudo, entretanto uma taxa superior para tetraciclina (83%) foi observada por esses autores. (117). Liu e colaboradores (2017) descreveram taxas de resistência para esses dois antimicrobianos superiores às obtidas em nosso trabalho, 97,4% dos 78 isolados de *E. coli* de origem aviária apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e tetraciclina (109). De modo semelhante, um estudo realizado na Coreia relatou altas taxas de resistência (acima de 75%) para essas drogas em *E. coli* isoladas de carne de frango (118).

Por outro lado, Cortés e colaboradores (2022) evidenciaram menor grau de resistência ao ácido nalidíxico (29%) e tetraciclina (24%) em *Salmonella* recuperadas de frangos de corte na Espanha, no período de 2015 a 2017. Segundo os autores, os resultados apresentados no estudo são reflexos da redução do uso desses antimicrobianos no setor avícola do país (119).

Ao analisar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados, observamos que 75% das nossas amostras se enquadravam no padrão “Multidrug-Resistant” (MDR) definido por Magiorakos e colaboradores (2012), ou seja, não apresentaram susceptibilidade a pelo menos um agente em no mínimo três categorias de antimicrobianos (7). Dentre os 18 antimicrobianos testados, incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, quinolonas, tetraciclina e outras classes importantes

para medicina humana, apenas imipenem e meropenem foram ativos contra 100% dos nossos isolados.

Nossos dados podem ser comparados ao de Rahman e colaboradores (2020), que encontraram 75,06% de isolados MDR em carnes de frango coletadas em lojas de aves em Bangladesh (120). Esses autores pesquisaram ainda determinantes genéticos que pudessem justificar a alta taxa de resistência aos antimicrobianos testados e encontraram relação entre o fenótipo de resistência e a presença de genes que conferiam resistência à gentamicina, tetraciclinas e estreptomicina. Em nosso estudo, genes de resistência relacionados as 18 classes de antibióticos testados não foram pesquisados, e, portanto, não foi possível estabelecer relação entre o fenótipo MDR e a presença de genes determinantes de resistência para essas 18 classes.

Outros autores demonstraram taxas de prevalência de MDR ainda mais altas. Na Índia, 94% das cepas de *E. coli* oriundas de frangos de corte apresentavam o perfil MDR (121). No Paraná, Korb e colaboradores (2015) evidenciaram que 81% dos isolados de *E. coli* de origem aviária analisados em seu estudo foram multirresistentes (117). Kim e colaboradores (2020) conduziram uma pesquisa de resistência antimicrobiana em isolados de *E. coli* de carne de frango na Coreia e encontraram 87,9% de cepas multirresistentes (118).

A circulação de Enterobacteriaceae MDR na cadeia produtiva avícola é um fenômeno preocupante e representa um alto risco à saúde pública. Esses microrganismos resistentes a diversas classes de antimicrobianos considerados importantes e altamente prioritários para a medicina humana estão associados a alta mortalidade e morbidade, aumentando ainda os custos com hospitalizações.

Ensaio de conjugação realizados neste trabalho demonstraram a capacidade de transferência intra e interespecies de plasmídeos abrigando o gene *mcr-1*, sendo este capaz de conferir o fenótipo de resistência à polimixina às cepas receptoras.

A análise do perfil clonal das nossas amostras permitiu observar uma grande diversidade genética, não havendo um clone prevalente. Essa observação corrobora com a hipótese de que a resistência às polimixinas nas amostras estudadas se deve à pressão seletiva relacionada ao uso de antimicrobianos, e não à disseminação de um clone epidêmico específico. De forma semelhante, Liu e colaboradores (2017) não encontraram clone prevalente ao avaliar os perfis de fragmentação por PFGE de 21 isolados de *E. coli* portadores de *mcr-1* obtidas de frangos na China. Ao realizar

tipagem molecular por “Multilocus Sequence Typing” - MLST, os autores demonstraram ainda que esses 21 isolados pertenciam a 10 “sequence types” (STs) diferentes. Dentre eles, foi identificado o ST10 que é um clone importante disseminado mundialmente (109).

Resultados preliminares da tipagem molecular por MLST em 10 das nossas amostras de *E. coli mcr-1* positiva demonstraram a presença de STs com notável relevância epidemiológica, como o ST10, ST38 e ST48, clones de alto risco associados à multirresistência e que já foram descritos em hospedeiros humanos e não humanos e em ambientes. Esses clones têm se destacado por contribuições substanciais na disseminação de genes de resistência clinicamente relevantes, incluindo aqueles que codificam resistência à colistina, cefalosporinas, carbapenemas e fluoroquinolonas (122).

Nossas observações reforçam a necessidade da redução do uso de antimicrobianos de importância médica em animais produtores de alimentos. Cada vez mais se faz necessário a adoção de alternativas aos antibióticos utilizados como promotores de crescimento na produção animal. Probióticos, prebióticos, enzimas, ácidos orgânicos, aditivos fitogênicos para rações e óleos essenciais são algumas das alternativas que apresentaram resultados relevantes em estudos recentes, conferindo efeitos iguais ou superiores aos antibióticos (69).

Abordagens multidisciplinares e integrativas no planejamento das estratégias de vigilância e monitoramento de RAM devem ser adotadas a fim de prevenir e controlar esse fenômeno, o que requer o trabalho em conjunto da saúde humana, animal e ambiental.

6 CONCLUSÕES

A alta frequência de resistência às polimixinas nas amostras estudadas parecem demonstrar uma persistência desta resistência em amostras isoladas de frangos quando comparados a outros estudos realizados no Brasil.

Todos os 87 isolados eram portadores de gene plasmidial *mcr*, sendo o *mcr-1* o mais prevalente entre as amostras, em consonância com o descrito por outros autores.

A alta prevalência do gene *mcr* em nossas amostras chama atenção para a possibilidade de disseminação silenciosa da resistência à colistina mediada por plasmídeo entre as amostras isoladas de frangos de corte e postura no Rio de Janeiro. Além de apontar para a necessidade de monitoramento desse gene na cadeia alimentar.

A análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos mostrou que 75% dos nossos isolados eram multirresistentes. Dentre os 18 antimicrobianos testados, apenas imipenem e meropenem foram ativos contra 100% desses isolados.

A capacidade de mobilização do plasmídeo contendo o gene *mcr-1* foi comprovada em duas amostras do estudo, sendo este capaz de conferir o fenótipo de resistência à colistina à cepa receptora.

A análise da diversidade genética por PFGE permitiu observar que não há um clone prevalente entre as amostras. Essa observação reforça a hipótese de que a resistência às polimixinas das amostras estudadas se deve à pressão seletiva relacionada ao uso de antimicrobianos, e não à disseminação de um clone epidêmico.

A alta prevalência de resistência às polimixinas e presença do gene *mcr* em amostras isoladas de frangos alertam para a necessidade de adoção de abordagens multidisciplinares e integrativas no planejamento das estratégias de vigilância e monitoramento de RAM, a fim de prevenir e controlar esse fenômeno, o que requer o trabalho em conjunto da saúde humana, animal e ambiental.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2016;43(2-3):155–76.
2. Prescott J. The resistance tsunami, antimicrobial stewardship, and the golden age of microbiology. *Vet Microbiol*. 2014; 171: 273-278.
3. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010; 74(3): 417-433.
4. Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. Epidemiology of multi-drug resistant gramnegative bacilli. *Rev Esp Quimioter*. 2016; 29 (Suppl 1):21–25.
5. Murray C, Ikuta K, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022; 399: 629–55.
6. O’Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations: the review on antimicrobial resistance [Internet]. 2016 [cited 2023 Jan 28]. Available from: [https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final paper_with cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final_paper_with_cover.pdf).
7. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268–81.
8. Lammie SL, Hughes JM. Antimicrobial Resistance, Food Safety, and One Health: The Need for Convergence. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2016; 7:287-312.
9. World Health Organization (WHO). Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2020. Geneva; 2020.
10. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbe and New Infect*. 2015; 6: 22–29.
11. Silva R, Oliveira B, Silva L, Oliveira M, Chaves G. Antimicrobial Resistance: formulation of the response in the global health context. *Saúde Debate*. 2020;44 (126):607-623.
12. Mackenzie JS, Jeggo M. The One Health Approach-Why Is It So Important? *Trop Med Infect Dis*. 2019 May 31;4(2):88.

13. Bordier M, Uea-Anuwong T, Binot A, Hendrikx P, Goutard FL. Characteristics of One Health surveillance systems: A systematic literature review. *Prev Vet Med.* 2020 Aug; 181:104560.
14. World Health Organization (WHO). No time to wait: securing the future from drug-resistant infections. Geneva; 2019.
15. Ministério da Saúde (BR). Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única 2018-2022 [Internet]. Brasília; 2019. [cited 2023 Jan 29]. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/antimicrobianos/plano-nacional-antimicrobianos-pan-br-14fev19-f/view>
16. Tortora G, Funke B, Case C. *Microbiologia*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed; 2017.
17. Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017; 57(13): 2857-2876.
18. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control.* 2006;34(5 Suppl 1):S20-8; discussion S64-73.
19. Potter R, D'Souza A, Dantas G. The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Drug Resist Updat.* 2016; 29:30-46.
20. Toombs-Ruane L, Benschop J, Burgess S, Priest P, Murdoch DR, French N. Multidrug resistant Enterobacteriaceae in New Zealand: a current perspective. *N Z Vet J.* 2017; 65(2):62-70.
21. Cohen R, Paikin S, Rokney A, Rubin-Blum M, Astrahan P. Multidrug-resistant enterobacteriaceae in coastal water: an emerging threat. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2020; 9:169.
22. Ferreira J, Penha Filho R, Kuaye A, Andrade L, Chang Y, Darini A. Virulence potential of commensal multidrug resistant *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2018; 65:251-256.
23. Platell J, Johnson J, Cobbold R, Trott DJ. Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Vet Microbiol.* 2011;153(1-2):99-108.
24. Koneman EW, Winn WC, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, et al. *Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido*. 6th ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro; 2010. 1565 p.
25. Brenner DJ, Farmer JJ. *Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey*, 2th ed. Springer. Nova York; 2005.

26. Parte AC. LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2018 [cited 2023 Jan 29];68(6):1825–9. Available from: <https://www.bacterio.net/>
27. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66(12):5575–99.
28. Moxley R. Family Enterobacteriaceae. *Veterinary Microbiology* [Internet]. 2022 [cited 2023 Jan 29]; 5:5-23. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119650836.ch5#:~:text=Summary,validly%20published%20and%20correctly%20named.>
29. Jorgensen JH, Carroll KC, Pfaller MA, American Society for Microbiology. *Manual of clinical microbiology*. 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. 2892 p.
30. WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. In: WHO [Internet]. Geneva, Switzerland; 2017 [cited 2023 Jan 29]. p. 1–7. Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
31. Rodrigues JF, Piazza RMF, Ferreira LCS, Martinez MB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2016; 47:3–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
32. Kathayat D, Lokesh D, Ranjit S, Rajashekara G. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies. *Pathogens*. 2021;10(4):467.
33. Liu CM, Stegger M, Aziz M, Johnson TJ, Espera K, Nordstrom L, et al. *Escherichia coli* ST131-H22 as a Foodborne Uropathogen. *mBio*. 2018; 9:4.
34. Markland SM, LeStrange KJ, Sharma M, Kniel KE. Old Friends in New Places: Exploring the Role of Extraintestinal *E. coli* in Intestinal Disease and Foodborne Illness. *Zoonoses Public Health*. 2015; 62: 491–496.
35. Da Silva GJ, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence*. 2012;3(1):18-28.
36. Hu J, Afayibo DJA, Zhang B, Zhu H, Yao L, Guo W, et al. Characteristics, pathogenic mechanism, zoonotic potential, drug resistance, and prevention of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Front Microbiol*. 2022; 13:104939.

37. Costa D, Vinué L, Poeta P, Coelho AC, Matos M, Sáenz Y, et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Vet Microbiol*. 2009 Sep 18;138(3-4):339-44.
38. Pitout JDD, Finn TJ. The evolutionary puzzle of *Escherichia coli* ST131. *Infect Genet Evol*. 2020; 81:104265.
39. Roer L, Overballe-Petersen S, Hansen F, Johannesen TB, Stegger M, Bortolaia V, et al. ST131 fimH22 *Escherichia coli* isolate with a bla_{CMY-2}/IncI1/ST12 plasmid obtained from a patient with bloodstream infection: highly similar to *E. coli* isolates of broiler origin. *J Antimicrob Chemother*. 2019 ;74(3):557-560.
40. Saldenberg ABS, Stegger M, Price LB, Johannesen TB, Aziz M, Cunha MPV, et al. *mcr*-Positive *Escherichia coli* ST131-H22 from Poultry in Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2020 Aug;26(8):1951-1954.
41. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):629-61.
42. Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC. Clinical implications of genomic adaptation and evolution of carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae*. *J Infect Dis*. 2017;215(Suppl 1): S18–27.
43. Franklin-Alming FV, Kaspersen H, Hetland MAK, Bakksjo RJ, Nesse LL, Leangapichart T, et al. Exploring *Klebsiella pneumoniae* in Healthy Poultry Reveals High Genetic Diversity, Good Biofilm-Forming Abilities and Higher Prevalence in Turkeys Than Broilers. *Front Microbiol*. 2021; 12:725414.
44. União Brasileira de Avicultura (BR). The saga of the Brazilian poultry industry - How Brazil has become the world's largest exporter of chicken meat [Internet]. São Paulo; 2011. [cited 2023 Feb 02]. Available from: <https://brazilianchicken.com.br/wp-content/uploads/A-saga-da-avicultura-brasileira-1.pdf>
45. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Plano de vigilância de Influenza Aviária e Doença de Newcastle. Brasília: MAPA; 2022.
46. Associação Brasileira de Proteína Animal (BR). Relatório Anual 2023. São Paulo: ABPA; 2023. [cited 2023 Mai 02]. Available from: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>
47. Silva VP, Van der Werf HM, Soares SR, Corson MS. Environmental impacts of French and Brazilian broiler chicken production scenarios: an LCA approach. *J Environ Manage*. 2014; 133:222-31.
48. Abreu VMN, Abreu PG. The challenges of animal environment on the poultry systems in Brazil. *R Bras Zootec*. 2011; 40: 1-14.

49. Ministério da Agricultura e Pecuária [Internet]. Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). [cited 2023 Feb 04]. Available from: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/programa-nacional-de-sanidade-avicola-pnsa>.
50. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003. Aprovar as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e Livres ou Controlados para *Salmonella Enteritidis* e para *Salmonella Typhimurium*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Seção 1, p. 03, 2003.
51. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa Nº 44 de 23 de agosto de 2001. Aprova as Normas Técnicas para o Controle e a Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas para a Micoplasmose Aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *synoviae* e *melleagridis*). Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Seção 1, 2001.
52. Hortêncio MC, Costa LRM, de Souza MVP, de Freitas WD, Fonseca BB, Silva MJB, et al. Time series evaluation of condemnation at poultry slaughterhouses enable to export in Southeastern Brazil (2009-2019): a tool for optimizing resources in the poultry production chain. BMC Vet Res. 2022;18(1):427.
53. Santos MJ, Zanini SF, Ferreira MF, Araujo FAC, Teixeira AP, Cipriano RC, et al. Main causes of chicken carcass condemnations in Espírito Santo, Brazil. Semin Agrar. 2021;42(3):1129–45.
54. Buzdugan SN, Chang YM, Huntington B, Rushton J, Guitian J, Alarcon P, et al. Identification of production chain risk factors for slaughterhouse condemnation of broiler chickens. Prev Vet Med. 2020; 181:105036.
55. Jaguezski AM, Engelmann AM, Machado INDR, Batti BPB. The effect of four commercial broiler hybrids and the season on occurrence of broiler condemnations in the abattoirs. Cienc Rural. 2020;50(10):1–8.
56. Rodrigues G, Santos LS, Franco OL. Antimicrobial Peptides Controlling Resistant Bacteria in Animal Production. Front Microbiol. 2022; 13:874153.
57. OECD/FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031 [Internet], Paris; 2022. [cited 2023 Feb 19]. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2022-2031_f1b0b29c-en.
58. Plata G, Baxter NT, Susanti D, Volland-Munson A, Gangaiah D, Nagireddy A, et al. Growth promotion and antibiotic induced metabolic shifts in the chicken gut microbiome. Commun Biol. 2022 ;5(1):293.
59. World Organization for Animal Health. Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals - 6th edition. Paris: OIE;2022.

60. Hosain MZ, Kabir SML, Kamal MM. Antimicrobial uses for livestock production in developing countries. *Vet World*. 2021 ;14(1):210-221.
61. FAO - Food and Agriculture Organization, WHO - World Health Organization. Code of practice to minimize and contain foodborne antimicrobial resistance CXC 61-2005. Adopted in 2005. Revised in 2021. Rome; 2021. [cited 2023 Feb 19]. Available from: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXC%2B61-2005%252FCXC_061e.pdf.
62. World Health Organization. WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. Geneva; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. [cited 2023 Feb 19]. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258970/9789241550130-eng.pdf?sequence=1>.
63. Muurinen J, Richert J, Wickware CL, Richert B, Johnson TA. Swine growth promotion with antibiotics or alternatives can increase antibiotic resistance gene mobility potential. *Sci Rep*. 2021; 11(1):5485.
64. Magnusson U, Sternberg S, Eklund G, Rozstalnyy. A. Prudent and efficient use of antimicrobials in pigs and poultry. *FAO Animal Production and Health Manual*. 2019; 23: 1-44.
65. Ministério da Agricultura e Pecuária [Internet]. Proibições de aditivos na alimentação animal. [cited 2023 Feb 19]. Available from: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/legislacao/proibicoes-de-aditivos-na-alimentacao-animal>.
66. Lentz SAM. Atualização sobre Uso Racional de Antimicrobianos e Boas Práticas de Produção [Internet]. Porto Alegre: Centro de Informações Estratégicas de Vigilância em Saúde; 2022. [cited 2023 Feb 19]. Available from: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistenciaantimicrobianos/publicacoes/Apostila_AtualizaosobreUsoRacionaldeAntimicrobianoseBoasPrcticasdeProduo.pdf
67. Kempf I, Jouy E, Chauvin C. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int J Antimicrob Agents*. 2016; 48(6):598-606.
68. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016. Proibir, em todo o território nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, Seção 1, p. 06, 2016

69. Mehdi Y, Létourneau-Montminy MP, Gaucher ML, Chorfi Y, Suresh G, Rouissi T, et al. Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Anim Nutr*. 2018; 4(2):170-178.
70. Liu Q, Li W, Feng Y, Tao C. Efficacy and safety of polymyxins for the treatment of *Acinetobacter baumannii* infection: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(6).
71. Poirel L, Aurélie J, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(2):557–96.
72. Yu Z, Qin W, Lin J, Fang S, Qiu J. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
73. Stefaniuk EM, Tyski S. Colistin Resistance in Enterobacterales Strains - A Current View. *Pol J Microbiol*. 2019;68(4):417-427.
74. Laxminarayan R, Matsoso P, Pant S, et al. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10014):168–175.
75. Shen Z, Wang Y, Shen Y, et al. Early emergence of mcr-1 in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect Dis*. 2016 Mar;16(3):293.
76. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin*. 2015 ;31(4):707-21.
77. Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 2014 ;67(2):147-51.
78. Li Z, Cao Y, Yi L, Liu JH, Yang Q. Emergent Polymyxin Resistance: End of an Era? *Open Forum Infect Dis*. 2019;6(10): ofz368.
79. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014 Nov 26; 5:643.
80. Aires CAM, Pereira PS, Asensi MD, Carvalho-Assef APDA. mgrB mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal surveillance swabs in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(11):6969–72.
81. Cannatelli A, Giani T, D’Andrea MM, Pilato V Di, Arena F, Conte V, et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(10):5696–703.
82. Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas MV, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among

Klebsiella pneumoniae isolates of worldwide origin. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(8):4762–6.

83. Cheng YH, Lin TL, Pan YJ, Wang YP, Lin YT, Wang JT. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(5):2909–13.

84. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis [Internet]. 2016;16(2):161–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).

85. Valiakos G, Kapna I. Colistin Resistant mcr Genes Prevalence in Livestock Animals (Swine, Bovine, Poultry) from a Multinational Perspective. A Systematic Review. Vet Sci. 2021 Nov 4;8(11):265.

86. Xavier BB, Lammens C, Ruhai R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Eurosurveillance. 2016;21(27):30280.

87. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, et al. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-3 in *Escherichia coli*. MBio. 2017;8(3):1–6.

88. Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. Eurosurveillance. 2017;22(31):1–5.

89. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. J Antimicrob Chemother. 2017;72(12):3317–24.

90. AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, Kirchner M, Dormer L, Nunez-Garcia J, et al. Erratum: mcr-1 and mcr-2 (mcr-6.1) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015 (The Journal of antimicrobial chemotherapy (2017) 72 10 (2745-2749)). J Antimicrob Chemother. 2018;73(10):2904.

91. Yang YQ, Li YX, Lei CW, Zhang AY, Wang HN. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2018;73(7):1791–5.

92. Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* article. Emerg Microbes Infect [Internet]. 2018;7(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41426-018-0124-z>

93. Carroll LM, Gaballa A, Guldemann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype *Typhimurium* Isolate. *MBio*. 2019;10(3):1–6.
94. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):508–16.
95. Hernández M, Iglesias MR, Rodríguez-Lázaro D, Gallardo A, Quijada N, Miguela-Villoldo P, Campos MJ, Píriz S, López-Orozco G, de Frutos C, Sáez JL, Ugarte-Ruiz M, Domínguez L, Quesada A. Co-occurrence of colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from cattle, Spain, September 2015. *Euro Surveill*. 2017 Aug 3;22(31):30586.
96. Phuadraksa T, Wichit S, Arikrit S, Songtawee N, Yainoy S. Co-occurrence of *mcr-2* and *mcr-3* genes on chromosome of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from healthy individuals in Thailand. *Int J Antimicrob Agents*. 2022 Oct;60(4):106662.
97. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Nov 1;75(11):3087-3095.
98. BrCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. *Brazilian Comm Antimicrob Susceptibility Test*. 2022;1–82.
99. BrCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Teste de sensibilidade aos antimicrobianos Método de disco-difusão BrCAST-EUCAST. *Brazilian Comm Antimicrob Susceptibility Test*. 2021;1–29.
100. CLSI. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. 30th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA; 2020. Available from: <http://www.emeraldinsight.com/doi/10.1108/08876049410065598>
101. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, 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*. 2018;23(6):17–00672.
102. Borowiak M, Baumann B, Fischer J, Thomas K, Deneke C, Hammerl JA, et al. Development of a Novel *mcr-6* to *mcr-9* Multiplex PCR and Assessment of *mcr-1* to *mcr-9* Occurrence in Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Isolates From Environment, Feed, Animals and Food (2011–2018) in Germany. *Front Microbiol*. 2020; 11:80.
103. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of

Escherichia coli O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog Dis. 2006;3(1):59–67.

104. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. Anal Biochem. 1995 Apr 1;226(2):235–40.

105. WHO. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 6th Revision 2018. Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. [Internet]. 2019 [cited 2023 Mar 29]. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?ua=1>

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

107. Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. Euro Surveill. 2016 ;21(17).

108. Barbieri NL, Pimenta RL, de Melo DA, Nolan LK, de Souza MMS, Logue CM. *mcr-1* Identified in Fecal *Escherichia coli* and Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) From Brazil. Front Microbiol. 2021; 12:659613.

109. Liu BT, Song FJ, Zou M, Zhang QD, Shan H. High Incidence of *Escherichia coli* Strains Coharboring *mcr-1* and *bla**N**DM* from Chickens. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(3):e02347-16.

110. Azizpour A, Saeidi NV. Investigation of antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with colibacillosis to ten antibacterial agents commonly used in the Iranian poultry industry. J Comp Pathol. 2017; 14(4): 2345-2352.

111. Büdel T, Kuenzli E, Campos-Madueno EI, Mohammed AH, Hassan NK, Zinsstag J, et al. On the island of Zanzibar people in the community are frequently colonized with the same MDR Enterobacterales found in poultry and retailed chicken meat. J Antimicrob Chemother. 2020;75(9):2432-2441.

112. Vasconcelos PC, Leite EL, Araújo WJ, Silva NMV, Saraiva MMS, Santos Filho L, et al. Draft genome sequence of *mcr-1*-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* ST359 from chicken carcasses in Northeastern Brazil. J Glob Antimicrob Resist. 2020; 23:135-136.

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

114. Aires CAM, da Conceição-Neto OC, Tavares E Oliveira TR, Dias CF, Montezzi LF, Picão RC, Albano RM, et al. Emergence of the Plasmid-Mediated *mcr-1* Gene in Clinical KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(7):e00317-17.
115. Luo Q, Wang Y, Xiao Y. Prevalence and transmission of mobilized colistin resistance (*mcr*) gene in bacteria common to animals and humans. *Biosafety and Health.* 2020; 2(2): 71-78.
116. Nang SC, Morris FC, McDonald MJ, Han ML, Wang J, Strugnell RA, et al. Fitness cost of *mcr-1*-mediated polymyxin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(6):1604–10.
117. Korb A, Nazareno ER, Costa LD, Nogueira KS, Dalsenter PR, Tuon FB, et al. Tipagem molecular e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli* de frangos de corte e de tratadores na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná. *Pesq. Vet. Bras.* 2015; 35(3):258-264.
118. Kim S, Kim H, Kim Y, Kim M, Kwak H, Ryu S. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* from Retail Poultry Meats in Korea. *J Food Prot.* 2020 ;83(10):1673-1678.
119. Cortés V, Sevilla-Navarro S, García C, Marín C, Catalá-Gregori P. Monitoring antimicrobial resistance trends in *Salmonella* spp. from poultry in Eastern Spain. *Poult Sci.* 2022;101(6):101832.
120. Rahman MM, Husna A, Elshabrawy HÁ, Alam J, Runa NY, Badruzzaman TM, et al. Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* from chicken meat. *Sci Rep.* 2020; 10: 21999.
121. Brower CH, Mandal S, Hayer S, Sran M, Zehra A, Patel SJ, et al. The Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Multidrug-Resistant *Escherichia Coli* in Poultry Chickens and Variation According to Farming Practices in Punjab, India. *Environ Health Perspect.* 2017 ;125(7):077015.
122. Fuga B, Sellera FP, Cerdeira L, Esposito F, Cardoso B, Fontana H, et al. WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. *ASM Journals.* 2022; 10:2.

8 APÊNDICES E/OU ANEXOS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Resistência e virulência em patógenos bacterianos e estudos de resistoma em ambientes de produção animal - uma abordagem de Saúde Única", protocolada sob o CEUA nº 6239180418 (ID 001020), sob a responsabilidade de **Miliane Moreira Soares de Souza** - 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 Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 17/07/2018.

We certify that the proposal "Resistance and virulence of bacterial pathogens and resistome analysis in animal production environment - an One Health approach", utilizing 100 Bovines (100 females), 30 Birds (males and females), protocol number CEUA 6239180418 (ID 001020), under the responsibility of **Miliane Moreira Soares de Souza** - 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 Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 07/17/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 07/2018 a 03/2021 Área: [Microbiologia E Imunologia Veterinária](#)

Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais		
Espécie:	Bovinos	sexo: Fêmeas	idade: 1 a 8 anos N: 100
Linhagem:	não se aplica		Peso: 300 a 400 kg
Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais		
Espécie:	Aves	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 30 a 37 dias N: 30
Linhagem:	não se aplica		Peso: 1 a 3 kg

Local do experimento: propriedades comerciais de produção leiteira e avícola

Seropédica, 02 de julho de 2019

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Carlos Alexandre Rey Matias
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro