



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



SÉRGIO DIAS DA COSTA JÚNIOR

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENÉTICA DE CEPAS DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE LEITE BOVINO, *Caracara plancus* E ISOLADOS CLÍNICOS: UMA
ABORDAGEM *One Health***

RECIFE

2022

SÉRGIO DIAS DA COSTA JÚNIOR

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENÉTICA DE CEPAS DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE LEITE BOVINO, *Caracara plancus* E ISOLADOS CLÍNICOS: UMA
ABORDAGEM *One Health***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Sistemas Biológicos

Orientador (a): Profa. Dra. Maria Betânia de Melo Oliveira

Coorientador (a): Profa. Dra. Eloiza Helena Campana

Prof. Dr. Vinicius Pietta Perez

RECIFE

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Costa Junior, Sérgio Dias da.

Diversidade fenotípica e genética de cepas de *Escherichia coli* isoladas do leite bovino, *caracara plancus* e isolados clínicos: uma abordagem *One health*. / Sérgio Dias da Costa Júnior. – 2022.

174 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Maria Betânia de Melo Oliveira.

Coorientadora: Eloiza Helena Campana.

Coorientador: Vinicius Pietta Perez.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Bactérias patogênicas. 2. CTX-M. 3. Multirresistência. 4. Biofilme. 5. Clones bacterianos. I. Oliveira, Maria Betânia de Melo. (orient.). II. Campana, Eloiza Helena. (coorient.). III. Perez, Vinicius Pietta. IV. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-252

SÉRGIO DIAS DA COSTA JÚNIOR

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENÉTICA DE CEPAS DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE LEITE BOVINO, *Caracara plancus* E ISOLADOS CLÍNICOS: UMA
ABORDAGEM *One Health***

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas.

APROVADO EM: 13/12/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)
Departamento de Bioquímica – Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel (Examinador Externo)
Departamento de Medicina Tropical – Centro de Ciências Médicas
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Arthur Willian de Lima Brasil (Examinador Externo)
Departamento de Morfologia – Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Paraíba

Dra. Sivoneide Maria da Silva (Examinador Externo)
Departamento de Bioquímica – Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Betânia de Melo Oliveira (Orientadora)
Departamento de Bioquímica – Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco

*Ao meu grande amor,
minha avó Elinez de Lima Bezerra.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guiou durante todo meu caminho, pois sem ele nada do que sou e conquistei até hoje seria possível.

Aos meus pais e avós pela educação que me ofereceram, por sempre terem confiado em mim e me apoiado em todas as decisões tomadas. Cada conquista minha sempre dedicarei a vocês.

À minha orientadora Profa. Maria Betânia, um ser humano magnífico, com um coração enorme, que sempre me ofereceu ótimos conselhos e ensinamentos. Aos meus coorientadores Profa. Eloiza Camapan e Prof. Vinicius Pietta, agradeço imensamente por fazer parte de seus laboratórios, por seus incentivos e por cada conhecimento dividido, pela nossa amizade e por todos os conselhos dados.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pelo conhecimento e espaço cedido para o desenvolvimento da pesquisa

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pelo conhecimento e espaço cedido para o desenvolvimento da pesquisa. Além disso a todos que fazem parte do Laboratório de Biologia Molecular (LaBiMol) do Centro de Ciências Médicas (CCM) do Laboratório de Endemias do Núcleo de Medicina Tropical (NUMETROP).

Aos amigos conquistados ao longo dessa jornada acadêmica que foi fundamental para ultrapassar as dificuldades diárias e por poder compartilhar de momentos para desopilar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) e à UFPE cuja estrutura física foi necessária para a realização do trabalho.

Aos meus parentes e amigos de longa data que tanto torceram e torcem pelas minhas conquistas, além de todo companheirismo e momentos de lazer. A todos aqueles que por ventura não foram mencionados aqui, mas que contribuíram de alguma maneira na minha vida e/ou na execução deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Microrganismos causadores de doenças zoonóticas, infecções humanas e síndromes alimentares, estão entre os principais alvos de estudos que utilizam a abordagem *One health*. A alta prevalência de cepas de *Escherichia coli* como agente colonizador ou patogênico no ambiente em geral e o impacto dessa espécie bacteriana na saúde humana, estão associados à importância desse microrganismo como biomarcador da disseminação da Resistência Antimicrobiana (RAM). Além disso, este microrganismo possui alta eficiência na regulação e aquisição de genes que codificam mecanismos de resistência aos antimicrobianos, principalmente sob a pressão seletiva desencadeada pelo uso de antimicrobianos, bem como alta prevalência de resistência aos betalactâmicos e polimixinas. O presente estudo apresentou duas abordagens: 1. revisão do estado-da-arte sobre a disseminação de cepas resistentes à polimixina em diferentes espécimes biológicos e a emergência do gene *mcr* no Brasil; e 2. análise experimental que avaliou a dinâmica de dispersão de bactérias resistentes de *E. coli* no ambiente (amostras de leite bovino cru), na saúde humana (isolados clínicos de infecções hospitalares) e em animais (aves da espécie *Caracara plancus*), e caracterização do fenótipo e genótipo desses microrganismos. Neste estudo foram obtidos 188 isolados bacterianos provenientes de 87 *swabs* obtidos da cloaca de *C. plancus* e de 20 amostras de leite cru, além de 26 isolados clínicos de origem hospitalar. Os microrganismos foram obtidos dos estados da Bahia (amostras de *C. plancus*) e Paraíba (amostras de leite e isolados clínicos) durante os anos de 2019, 2021 e 2022. As bactérias foram caracterizadas quanto a fermentação de lactose e morfologia das colônias em meio MacConkey e identificadas molecularmente pela *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight* (MALDI-TOF). Após esta triagem, colônias da espécie foram submetidas ao teste de disco-difusão em ágar, de acordo com o protocolo do *Clinical Laboratory and Stanrd Institute* (CLSI). Posteriormente foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de 26 genes de betalactamases e do gene de resistência à colistina mediada por plasmídeo. A *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* – PCR (ERIC-PCR) foi utilizada para determinar o perfil clonal dos isolados. Por fim, foram aplicados e comparados os métodos de coloração com Cristal Violenta (CV) e crescimento em meio vermelho-congo para analisar a capacidade de produção de biofilme. Como primeiro resultado, foram obtidos dois artigos de revisão contemplando os temas: “Disseminação da resistência à polimixina no ambiente” e “Bacilos Gram-Negativos carreando o gene *mcr* no Brasil”. Como resultados experimentais iniciais foram obtidos 104 microrganismos de *C. plancus* e 84 nas amostras de leite cru, nos quais *E.*

E. coli representou 37,5% (n=39) e 13,4% (n=11), respectivamente. Entre as cepas de *E. coli* de aves 15,4% (6/39) foram produtoras de Betalactamases de Espectro Estendido (ESBL), em leite 36,3% (4/11) e nos isolados clínicos 23,1% (6/26). O gene *bla*_{CTX-M-1/2} foi o mais prevalente entre as amostras de diferentes origens, apresentando incidência de 18% (7/39), 18,1% (2/11) e 23,1% (6/26) nas amostras de *C. plancus*, leite cru e clínicas, respectivamente. É importante destacar que o estudo reporta o primeiro caso de *E. coli* portadora de *bla*_{KPC} com susceptibilidade aos carbapenêms em amostras de origem animal e do determinante genético *bla*_{NDM} em isolados do estado da Paraíba, Brasil. Não foram detectadas cepas portadoras do gene *mcr-1* em nenhuma das amostras investigadas. A proporção de cepas produtora de biofilme foi semelhante entre os isolados clínicos (73,1%, n=19) e de aves (74,3%, n=39), no entanto apresentou incidência menor entre as cepas de leite cru (45,4%, n=5). O resultado da genotipagem demonstrou a disseminação de cepas portadoras de genes de resistência aos betalactâmicos em diferentes aves, em diferentes amostras de leite (provenientes de tanques distintos) e em diferentes pacientes no ambiente hospitalar. Este estudo identificou a dispersão de alguns determinantes de resistência em populações de *E. coli* nos estados da Bahia e Paraíba, e revelou a importância do monitoramento dessa bactéria na disseminação da RAM nos locais investigados. Os dados obtidos são preocupantes e demonstram a necessidade de pesquisas adicionais baseadas nessa perspectiva *One Health* para o enfrentamento a RAM, principalmente, relacionada à disseminação de cepas de *E. coli* produtoras de CTX-M em animais, alimentos e humanos.

Palavras-chave: Bactérias patogênicas; CTX-M; Multirresistência; Biofilme; Clones Bacterianos.

ABSTRACT

Zoonotic diseases pathogen microorganisms, human infections, and alimentary syndromes are among the main targets of studies with the One health approach. The high prevalence of *Escherichia coli* strains as a colonizing agent or pathogen in the general environment and its impact of this species of bacteria in human health are associated with the importance of this microorganism as a biomarker of the dissemination of Antimicrobial Resistance (AMR). Supplementary to it, this bacterium has a high regulating efficiency and acquirement of genes that regulate antimicrobial resistance mechanisms, primarily the selective pressure triggered by the use of antimicrobials along with the high prevalence of beta-lactam and polymyxins. The present study presented two approaches: 1. State-of-the-art review over the dissemination of isolates resistant to polymyxin in different biological specimens and the rise of *mcr* gene in Brazil; 2. Experimental analysis that evaluated the dynamic of dispersion of resistant *E. coli* bacteria in the environment (raw bovine milk samples), in human health (clinical isolates from hospital-acquired infections) and in animals (birds of the species *Caracara plancus*), and the genotypic and phenotypic characterization of this microorganisms. In this study 188 bacterial isolates were obtained, 87 obtained of *C. plancus* cloaca, 20 samples from raw milk and 26 from clinical isolates from hospitals. Microorganisms originated from Bahia (*C. plancus*) and Paraíba (raw milk and clinical isolates) during the years of 2019, 2021 and 2022. The bacteria were characterized regarding the lactose fermentation, colony morphology in MacConkey medium and identified molecularly using *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (MALDI-TOF). After the screening, colonies of the species were subjected to the disk-diffusion method, according to the Clinical Laboratory and Standard Institute (CLSI). Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to the detection of 26 beta-lactamases genes and the plasmid mediated colistin resistance gene. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - PCR (ERIC-PCR) was utilized to recognize the clonal profile of the isolates. Congo-red agar method and Crystal Violet Assay were applied in comparison to verify biofilm production capability. As a primary result, two academic articles reviews were obtained regarding the subjects: “Dissemination of polymyxin-resistance in the environment” and “Gram-negative bacilli carrying the *mcr* gene in Brazil”. As a result of the initial experiments were obtained 104 microorganisms from *C. plancus* and 84 from the raw milk samples, which *E. coli* represented 37.5% (n=39) and 13.4% (n=11), respectively. Among bird *E. coli* strains 15.4% (6/39) were Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL), in milk 36.3% (4/11) and in the clinic isolates 23.1% (6/26). The *bla*_{CTX-M-1/2} gene prevailed

amongst different origins, presenting an incidence of 18% (7/39), 18.1% (2/11) and 23.1% (6/26) in the *C. plancus*, raw milk and clinical isolates samples respectively. The study reports the first case of *E. coli* carrying the *bla*_{KPC} gene with sensibility to the carbapenems in samples originated from animal and the genetic determinant *bla*_{NDM} in isolates from the Paraíba state, Brazil. The *mcr-1* gene was not detected in tested samples. The proportion of biofilm producing strains in the clinical isolates (73.1%, n=19) and bird isolates (74.3%, n=39), were similar. Nonetheless, minor incidence was presented in the raw milk isolates (45.4%, n=5). The result from the genotyping assorted the dissemination of the strains carrying the genes of beta-lactams resistance in different birds, different milk samples (from distinct tanks) and from the hospital environment. This study identified the dispersion of some determinants of resistance in *E. coli* populations in the states of Bahia and Paraíba and revealed the importance of the monitoring of this bacterium in the dissemination of AMR in the investigated locations. The data obtained are alarming and shows the need of additional research based on One Health perspective to decrease AMR, mainly, regarding the *E. coli* CTX-M producing strains dissemination in animals, food, and human.

Keywords: Pathogenic Bacteria; CTX-M; Multidrug-Resistance; Biofilm; Bacterial Clones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Mecanismos de resistência bacteriana.....	22
Figura 2 -	Estrutura química de betalactâmicos.....	23
Figura 3 -	Relação entre a introdução da utilização de betalactâmicos e o surgimento das enzimas betalactamases.....	27
Figura 4 -	Estrutura química das polimixinas. Em (A) a polimixina B, em (B) a colistina.....	31
Figura 5 -	Atividade da MCR na ligação da fosfatidiletanolamina (PEA) ao LPS do lipídio A. Em (A) a molécula de lipídio A e em (B) o lipídio A após a ação da enzima MCR-1.....	34
Figura 6 -	Em (A) a ave de rapina Carcará, em (B) um ninho desse animal medindo cerca de 50 cm de diâmetro.....	45
Figura 7 -	Mastite aguda severa bovina causada por bactéria Gram-negativa.....	47
Figura 8 -	Potencial de transmissão de cepas resistentes a antibióticos no ambiente.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Variantes do gene <i>mcr</i> envolvidas na resistência à polimixina, ano, localização, plasmídeo e origem da amostra biológica.....	36
Tabela 2 -	Patógenos de prioridade global segundo a OMS.....	42
Tabela 3 -	Métodos de controle e prevenção de IRAS no ambiente hospitalar.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN	Ágar nutriente
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ArmA	Aminoglicosídeo Resistência Metiltransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Infusão de Cérebro-Coração
BGN	Bacilos Gram-Negativos
BGN-MDR	Bacilos Gram-Negativos Multidroga-Resistentes
bp	Pares de Bases
BrCAST	Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMH	Caldo Müeller Hinton
CV	Cristal Violeta
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERIC-PCR	Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano – Reação em Cadeia da Polimerase
ESBL	Beta-lactamases de Espectro Estendido
IH	Infecção Hospitalar
IMP	Imipenemase
IRAS	Infecções Relacionas à Assistência a Saúde
ITUs	Infecções do Trato Urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MDR	Multidroga-Resistentes
MDS	Multidroga Sensível
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MLB	Metalo-beta-lactamases
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinase

PCR	Reação em Cadeira da Polimerase
pH	Pontencial Hidrogeniônico
SPM	São Paulo Metallo-Betalactamase
spp.	Espécies
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV-B	Ultravioleta B
VIM	Verona Imipenemase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	21
3.2 UMA VISÃO GERAL SOBRE OS BETALACTÂMICOS.....	23
3.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS BETALACTAMASES.....	26
3.3.1 Classe A de Ambler.....	28
3.3.2 Classe B de Ambler.....	29
3.3.3 Classe C de Ambler.....	29
3.3.4 Classe D de Ambler.....	30
3.4 POLIMIXINAS: UMA VISÃO GERAL.....	30
3.5 RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS.....	32
3.6 RESISTÊNCIA À COLISTINA MEDIADA POR PLASMÍDEO (<i>mcr</i>).....	34
3.7 BIOFILME.....	37
3.8 A IMPORTÂNCIA DAS ANÁLISES DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.....	38
3.9 <i>Escherichia coli</i>	39
3.10 INETRAÇÃO ENTRE HUMANOS E ANIMAIS.....	42
3.11 <i>Caracara plancus</i> : UMA AVE DE RAPINA COMUM NO BRASIL.....	44
3.12 CONTAMINANTES DO LEITE BOVINO.....	45
3.13 MASTITE BOVINA: CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	46
3.14 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS).....	48
3.15 O PAPEL DA COVID-19 NAS IRAS.....	51
3.16 SAÚDE ÚNICA (<i>One Health</i>)	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1 ARTIGO 1: Dissemination and prevalence of polymyxin-resistant bacteria of clinical and environmental origin.....	56
4.2 ARTIGO 2: Bacilos Gram-negativos portadores do gene <i>mcr</i> no Brasil: um patógeno em ascensão.....	57
4.3 ARTIGO 3: Disseminação de cepas de <i>Escherichia coli</i> resistentes e produtoras de biofilme em aves da espécie <i>Caracara plancus</i> no Nordeste do Brasil.....	85

4.4 ARTIGO 4: <i>Escherichia coli</i> : um biomarcador de disseminação da Resistência Antimicrobiana (RAM) no estado da Paraíba, nordeste do Brasil.....	112
5 CONCLUSÃO.....	139
6 SUMULA CURRICULAR (2020-2022).....	141
REFERÊNCIAS.....	145
APÊNDICE A - ARTIGO 1 PUBLICADO.....	157
APÊNDICE B – ARTIGO 2 ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	172
APÊNDICE C – ARTIGO 4 SUBMETIDO.....	173

1 INTRODUÇÃO

As bactérias são organismos que possuem uma alta capacidade de adaptação ao meio ambiente e tornam-se resistentes a toxinas e antimicrobianos por diversos mecanismos. O fenômeno no qual esses microrganismos conseguem sobreviver, quando expostos a concentrações consideradas como terapêuticas dos antimicrobianos é denominado de Resistência Antimicrobiana (RAM). Além disso, a multiplicação rápida dos microrganismos está associada à facilidade do surgimento de mutações em seu material genético que podem acarretar novos padrões de RAM (COSTA-JÚNIOR et al., 2020; SANTOS et al., 2022).

Os betalactâmicos estão entre as principais classes de antibióticos utilizados no tratamento de infecções por bactérias Gram-Negativas. Porém, esses microrganismos são capazes de produzir enzimas betalactamases, responsáveis pela hidrólise e inativação desses antimicrobianos, impossibilitando a atividade destes frente às bactérias. Enterobactérias Produtoras de Betalactamases de Espectro Estendido (ESBL) são consideradas uma ameaça séria à saúde humana e animal. Essas enzimas são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. As ESBLs mais observadas são variantes de TEM-1, TEM-2, SHV-1 e CTX-M. Além disso, podem ser transferidas entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes, sendo a detecção de cepas produtoras de ESBL associada diretamente a bactérias multirresistentes e altas taxas de mortalidade (CODJOE, DONKOR, 2017; COSTA-JÚNIOR et al., 2021).

Por conta das opções terapêuticas restritas para o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos, ocorreu um aumento significativo no uso de carbapenêmicos na clínica médica. A resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias pode surgir principalmente de genes que codificam carbapenemases, que são capazes de realizar a hidrólise de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Até o início da década de 1990, acreditava-se que as carbapenemases eram codificadas apenas por genes cromossômicos em algumas espécies bacterianas. Contudo, pesquisadores identificaram as enzimas imipenemase (IMP-1), oxacilinase-23 (OXA-23) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) codificadas por elementos genéticos móveis em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *K. pneumoniae* (CODJOE, DONKOR, 2018; OLIVEIRA SANTOS et al., 2022).

Com o aumento da prevalência de cepas produtoras de enzimas carbapenemases em bacilos Gram-negativos, houve o retorno do uso das polimixinas na clínica médica e veterinária, como uma das últimas alternativas de tratamento de infecções por bactérias multirresistentes. As polimixinas são antibióticos polipeptídeos que atuam desestabilizando os Lipopolissacarídeos (LPS) da membrana celular das bactérias Gram-negativas. Porém, nos últimos anos, algumas espécies de bacilos Gram-negativos, anteriormente susceptíveis às polimixinas, têm sido reportadas como resistentes a esta classe de antimicrobianos (LIMA et al., 2020; COSTA-JÚNIOR et al., 2020).

A resistência às polimixinas pode ser de natureza intrínseca, como a observada em *Proteus* sp., *Providencia* sp. e *Serratia* spp., ou adquirida através de mutações cromossômicas. Posteriormente, foi identificada a resistência às polimixinas relacionada a um gene de resistência que poderia estar presente em elementos genéticos móveis, o *mcr*, codificado no plasmídeo de uma cepa de *E. coli* na China, isolada de amostras de animais (FALAGAS et al., 2005; LIU et al., 2016; COSTA-JÚNIOR et al., 2021). Nos anos seguintes, estudos identificaram a presença do gene *mcr-1*, e outras variantes do gene, em outras espécies de enterobactérias, *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* (CASELLI et al., 2018; HAMEED et al., 2019).

Além do perfil de resistência, a capacidade desses microrganismos de produzirem biofilme é outra característica preocupante. Os microrganismos produtores de biofilme são responsáveis por causar a maior parte das infecções bacterianas humanas e animais (LUINI et al., 2015; NOEL et al., 2016; KAR et al., 2016). Estes, são comunidades biológicas com elevado grau de organização, nas quais os microrganismos formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais. Essas comunidades biológicas são capazes de produzir matrizes poliméricas nas quais se encontram imersas e aderidas a uma superfície biótica ou abiótica, promovendo uma barreira protetora entre as bactérias e o ambiente, atuando como um importante fator de virulência e patogenicidade, tornando as bactérias altamente resistentes aos antimicrobianos e a imunidade do hospedeiro (ACKER et al., 2014; GABRILSKA, RUMBAUGH, 2015; COSTA-JÚNIOR et al., 2018). A disseminação de patógenos resistentes e produtores de biofilme, tem implicado na falha terapêutica em muitas doenças infecciosas, aumentando os custos no tratamento e tempo de internação (TEUBER, 2001; LINARDI et al., 2014; COSTA-JÚNIOR., 2018).

Análises epidemiológicas moleculares são essenciais para a detecção da origem e da disseminação de microrganismos, com a finalidade de desenvolver estratégias preventivas para controlar a transmissão de bactérias. Os métodos de genotipagem bacteriana são utilizados como uma ferramenta para a diferenciação de um grupo bacteriano fenotipicamente idêntico, tendo impacto direto na intervenção terapêutica por serem essenciais na identificação de cadeias de transmissão em surtos. Além disso, a partir das ferramentas de genotipagem bacteriana é possível evidenciar as relações entre microrganismos de mesma espécie em determinada área geográfica durante um período de tempo determinado (JACOMÉ et al., 2016; TABAK et al., 2019; COSTA-JÚNIOR et al., 2021).

Apesar de possuir como *habitat* natural o trato gastrointestinal de animais endotérmicos, como os humanos, cepas de *E. coli* podem ser encontradas amplamente dispersa no ambiente, principalmente em águas de mares e rios e alimentos de agricultura, devido ao processo inadequado do despejo de esgoto. A grande variedade de fatores de virulência em bacilos Gram-negativos está relacionada ao aumento da patogenicidade desses microrganismos, que são capazes de modificar a superfície celular, liberar toxinas invasinas e realizar a translocação de proteínas efetoras por sistemas de secreção. Além disso, devido à alta eficiência das cepas de *E. coli* na regulação e aquisição de genes que codificam mecanismos de resistência aos antimicrobianos, principalmente sob a pressão seletiva desencadeada pelo uso de antimicrobianos, são reportadas alta prevalência de resistência a betalactâmicos e polimixinas entre cepas dessa espécie. Dessa forma, devido a sua ampla dispersão no ambiente, na saúde humana e animal e em alimentos, esses microrganismos são considerados como marcadores importantes para estudos de rastreamento da dispersão da RAM. (PELEG et al., 2010; MALUTA., 2012; SIQUEIRA et al., 2018; CORDEIRO-MOURA et al., 2022).

O leite é um fluido secretado por fêmeas mamíferas visando atender as necessidades nutricionais de indivíduos neonatos e utilizado como um importante componente alimentar da dieta de adultos. Porém, a coleta inadequada e o processamento desse fluido para o procedimento de distribuição expõem este aos microrganismos (VIDAL et al., 2017; WEBER et al., 2019). O processo de pasteurização foi implementado na indústria alimentícia como um método antimicrobiano, no entanto, ainda são relatados diversos casos de processos infecciosos em indivíduos após consumo de leite pasteurizado (WEBER et al., 2019). A mastite bovina é considerada uma das principais causas de contaminação de leite e infecções

bacterianas são apontadas como principal causa de mastite infecciosa em bovinos. São descritas a existência de mais de 140 espécies bacterianas envolvidas na etiologia da mastite. Muitas das infecções nestes animais são causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos (OLIVER, MURINDA, 2012; KAYESH et al., 2014; CALAHORRANO-MORENO et al., 2022). *E. coli* representa cerca de 15-20% dos casos de mastite infecciosa bacteriana em bovinos, sendo a principal causadora da doença entre os bacilos Gram-negativos. Quando causada pela *E. coli*, esta doença pode variar de uma condição leve até uma sepse fatal no animal (BOTREL et al., 2010; LIU et al., 2014; COSTA-JÚNIOR et al., 2018). Esta, também pode ser encontrada na microbiota entérica de aves e mamíferos. Embora, aproximadamente 90% dessas cepas sejam comensais e não patogênicas, a porcentagem patogênica pode estar relacionada a infecções intestinais e/ou extra-intestinais (SILVA et al., 2021).

As aves de rapina são consideradas indicadoras de qualidade ambiental, graças a seu destaque como predadoras de topo em cadeias e teias alimentares. Algumas espécies também podem se adaptar a ambientes antropizados como é o caso do *Caracara plancus*. Esse contato com áreas antropizadas aumenta também o contato dessas aves com microrganismos que possuem resistência aos antibióticos (FERGUSON-LEES; CHRISTIE, 2001; AZEVEDO et al., 2003; SILVA et al., 2020).

Assim, a abordagem *One Health* é amplamente enfatizada nos planos estratégicos para o controle de doenças zoonóticas, segurança alimentar, mudanças climáticas e controle da disseminação de bactérias resistentes. Sendo um dos objetos de estudo da abordagem *One Health*, o controle da disseminação da RAM (MACHALABA et al., 2021; FUGA et al., 2022). Porém, até o momento, os estudos que destacam as possíveis aplicações na prática clínica e os benefícios advindos com o uso desse tipo de abordagem ainda são escassos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Aprofundar sobre a temática de resistência bacteriana às polimixinas em isolados clínicos e ambientais por meio de artigos de revisão e avaliar a dinâmica de disseminação de cepas de *E. coli* resistentes e produtoras de biofilme em diferentes ambientes sob a perspectiva de *One health*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um estudo de revisão sobre a disseminação de cepas resistente às polimixinas em amostras de origem ambiental
- Realizar um estudo de revisão sobre a disseminação de cepas portadoras do gene *mcr-1* no Brasil em amostras de diferentes origens biológicas;
- Rastrear e identificar as cepas de *E. coli* em amostras de leite bovino, *C. plancus* e isolados clínicos;
- Determinar o perfil de susceptibilidade das cepas de *E. coli* aos principais antimicrobianos utilizados nas clínicas veterinária e humana;
- Investigar os genes de resistência codificadores de betalactamases e resistência à colistina mediada por plasmídeo;
- Avaliar o perfil fenotípico de formação de biofilme dos isolados.
- Realizar a tipagem molecular de cepas de *E. coli* de diferentes origens biológicas e interpretação da dinâmica de disseminação desses isolados sobre a perspectiva *One health*;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA RESISTÊNCIA BACTERIANA

A RAM é o fenômeno no qual os microrganismos permanecem se multiplicando mesmo após serem expostos a concentrações de antimicrobianos superiores às doses terapêuticas usadas nos organismos animal e humano. As bactérias possuem uma alta capacidade de adaptação ao meio ambiente e tornam-se resistentes a determinado antimicrobiano por vários mecanismos. Além disso, a multiplicação rápida dos microrganismos está associada à facilidade do surgimento de mutações em seu material genético que podem acarretar novos padrões de resistência bacteriana (COSTA-JÚNIOR et al., 2020; SANTOS et al., 2022).

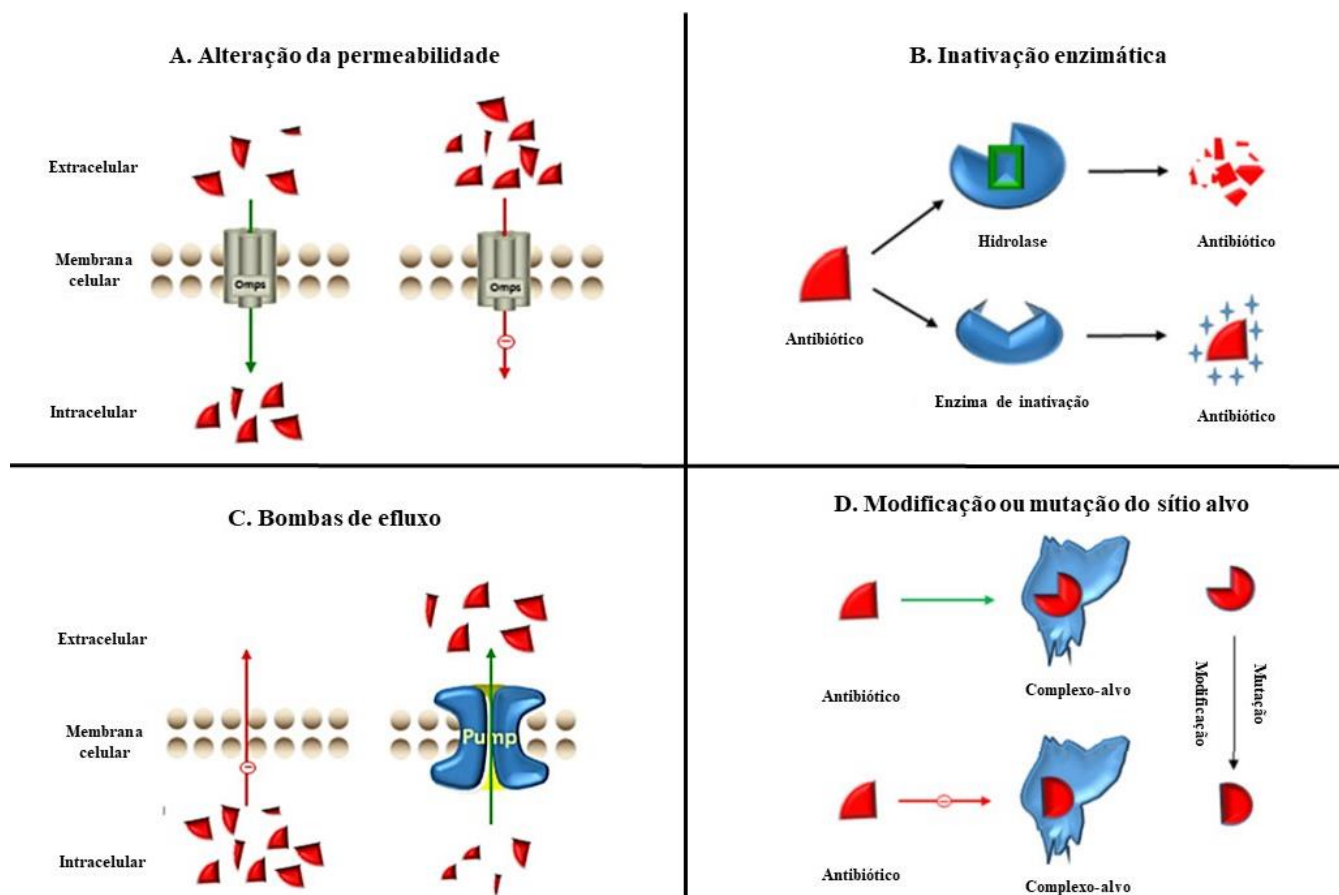
Determinados antimicrobianos são advindos de substâncias extraídas de microrganismos. Este fato, é possibilitado pela capacidade de resistência intrínseca a este antimicrobiano. *Streptomyces erythraeus*, por exemplo, é produtor da eritromicina, e naturalmente resistente a este antimicrobiano devido à presença de mecanismos de autoproteção que impedem a sua autodestruição. Assim, a resistência intrínseca é a habilidade natural de um microrganismo resistir a moléculas tóxicas e antimicrobianos. Patógenos oportunistas são caracterizados por apresentarem alta resistência intrínseca a diversos antimicrobianos (BLAIR et al., 2014; COSTA-JÚNIOR et al., 2020).

Ao contrário dos mecanismos intrínsecos, a resistência adquirida está relacionada à pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos e levando a populações bacterianas com resistência irreversível (AZAM, KAN, 2018; COSTA-JÚNIOR et al., 2021; SANTOS et al., 2022). Além disso, considerando a existência no meio ambiente de microrganismos que possuem mecanismos de autoproteção a determinadas classes de antimicrobianos, admite-se que além de mutações no DNA das bactérias, a origem da resistência adquirida advém da transferência de genes de resistência, relacionadas aos métodos de recombinação bacteriana. O material genético transferido de uma bactéria a outra pode conter informações que desencadeiam alterações em características físico-químicas da bactéria e essas mudanças podem conferir resistência aos agentes antimicrobianos (BLAIR et al., 2014; LAMBRECHT et al., 2019).

Dessa forma, são classificados como mecanismos de resistência aos antimicrobianos as alterações relacionadas a: A) bloqueio da entrada do antimicrobiano, através da alteração da permeabilidade da membrana; B) mecanismo enzimático, através da modificação do antimicrobiano, promovendo a perda da atividade antimicrobiana; C) bomba de efluxo,

transportando os antimicrobianos para fora da célula e D) alteração do sítio de ação do antimicrobiano, impossibilitando sua atuação no sítio específico da bactéria (Figura 1) (BLAIR et al., 2014; BELLO et al., 2022; ZHANG, CHENG, 2022).

Figura 1. Mecanismos de resistência bacteriana



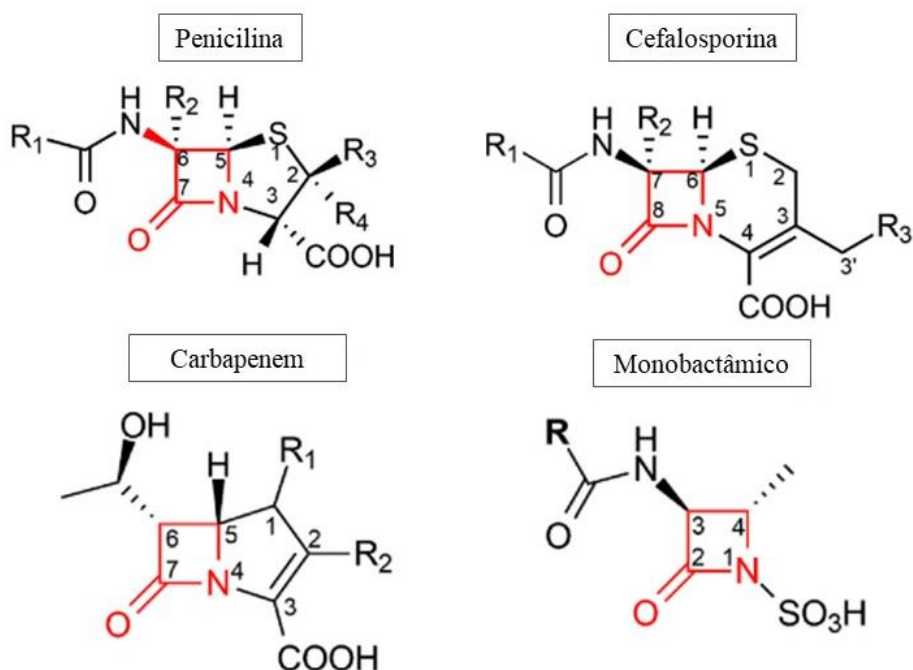
Fonte: Adaptado de ZHANG, CHENG (2022).

O mecanismo de resistência bacteriana por meio da expressão de enzimas que inativam os antimicrobianos, apresenta grande importância na RAM aos betalactâmicos, sendo o principal mecanismo utilizado por bactérias Gram-negativas para combater o efeito desses antimicrobianos. As enzimas inativadoras desse fármaco, conhecidas como betalactamases, conferem resistência por meio da hidrólise desses fármacos. Embora as betalactamases possam ser codificadas no cromossomo bacteriano, a utilização expressiva desses antimicrobianos na clínica humana e animal, associada ao processo de pressão seletiva, impulsionou a disseminação de genes de resistência, entre diferentes espécies de bactérias Gram-negativas, por meio de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons (BELLO et al., 2022; ZHANG, CHENG, 2022).

3.2 UMA VISAO GERAL SOBRE OS BETALACTÂMICOS

Os antibióticos betalactâmicos são caracterizados por possuírem em sua estrutura química um grupamento químico heterocíclico azetidinona denominado anel betalactâmico, com diferentes estruturas químicas lineares, que estão relacionadas a diferenciação das características químicas e espectro de ação dessas moléculas (Figura 2). Esses antimicrobianos incluem em sua classe os grupos das penicilinas naturais e semissintéticas, cefalosporinas de primeira a quinta geração, monobactâmicos, carbapenêmicos e os inibidores de betalactamases. São produzidos naturalmente por diferentes organismos, *Penicillium* spp. e *Cephalosporium* spp, para penicilinas e cefalosporinas, respectivamente, e bactérias de diferentes espécies para monobactâmicos e carbapenêmicos (VIGLIOTTA et al., 2020; De ROSA et al., 2021).

Figura 2. Estrutura química de betalactâmicos



Fonte: Adaptado de De ROSA et al. (2021).

Betalactâmicos estão entre as classes de medicamentos mais frequentemente prescritas na clínica médica. Seu advento a partir de 1929 mudou drasticamente o combate às doenças infecciosas bacterianas. A penicilina G foi o primeiro representante do grupo a ser descoberto por Alexander Fleming (FLEMING et al., 1929). O farmacologista italiano Giuseppe Brotzu, em 1945, identificou a presença de outros compostos com atividade semelhantes à penicilina,

a partir de compostos obtidos de *Cephalosporium* spp. Porém, a classe das cefalosporinas teve origem somente em 1953 (ABRAHAM, NEWTON, 1961). As outras classes de betalactâmicos, foram descobertas recentemente, em um esforço para identificar novas opções de tratamento frente às infecções bacterianas (De ROSA et al., 2021).

A administração desse antibiótico pode ocorrer por diferentes vias, de acordo com o tipo de penicilina a ser administrada. A penicilina V é preferivelmente administrada por via oral, no caso da penicilina G e piperacilina por via parenteral, oxacilina e aminopenicilinas podem ser administradas por ambas as vias: oral e parenteral. Além disso, outros fármacos dessa classe podem ser administrados por via intramuscular e intravenosa (CODJOE, DONKOR, 2018). Por via oral, deve-se considerar que o alimento pode afetar a absorção. Algumas moléculas, como cefuroxima e cefpodoxima, tem absorção diminuída por bloqueadores H2 ou antiácidos não absorvíveis (SHAIKH et al., 2015; LIMA et al., 2020).

Esses antimicrobianos possuem atividade bactericida, interrompendo a síntese da parede celular bacteriana por meio do bloqueio da transpeptidação do peptidoglicano, como resultado da ligação química covalente que ocorre com as Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBPs). Espécies bacterianas diferentes podem possuir conjuntos distintos de PBPs, esses receptores podem variar em até oito proteínas por espécie (BUSH, BRADFORD, 2016; VIGLIOTTA et al., 2020). As PBPs são essenciais na fase final da síntese do peptidoglicano, apresentando atividades de carboxipeptidases e transpeptidases (SHAIKH et al., 2015; De ROSA et al., 2021).

Dentro da classe das cefalosporinas, podem ser divididas em cinco gerações de acordo com seu espectro de atividade. As de primeira geração possuem bom espectro contra Gram-positivos, exceto *Enterococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), além disso, possui limitada atividade frente aos BGN. Possuem ação contra bactérias anaeróbias da cavidade oral. A segunda geração, apresenta aumento no espectro de ação para Gram-negativos, sendo utilizada no tratamento de infecções causadas pelos cocos Gram-negativos *Haemophilus influenza* e *Neisseria* spp. As cefalosporinas de terceira apresentam baixa atividade frente Gram-positivos, porém, são importantes fármacos frente enterobactérias. As cefalosporinas de quarta geração são mais resistentes às betalactamases de Gram-negativas. Em decorrência disso, amplia seu espectro ao englobar *P. aeruginosa* e enterobactéria. A quinta geração possui atividade contra Gram-positivos, incluindo MRSA e *S. epidermidis*, além de alta eficácia frente microrganismos Gram-positivos anaeróbios e Gram-negativos (SHAIKH et al., 2015; BATRA et al., 2021).

Entre os monobactâmicos o aztreonam é o único comercialmente disponível. Esse

antimicrobiano tem amplo espectro de atividade frente BGN aeróbios, mas não tem atividade contra bactérias Gram-positivas ou anaeróbias. É utilizado como opção terapêutica de pacientes com infecções por BGN que apresentam alergias às penicilinas. No entanto, microrganismos capazes de sintetizar β -lactamase AmpC e de espectro ampliado podem apresentar resistência ao aztreonam (ARAUJO, AZEVEDO, 2020).

A utilização clínica dos carbapenêns ocorreu na década de 1980, como última opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por BGN MDR. Esses antimicrobianos possuem atividade contra bactérias produtoras de ESBL e AmpC. A tienamicina foi o primeiro carbapenêmico e serviu como composto modelo para todos os carbapenêns (MORRILL et al., 2015). Imipenem e meropenem são extensivamente prescritos por demonstrarem eficácia no tratamento de infecções graves e polimicrobianas, incluindo infecções intra-abdominais, pneumonias e septicemias. No entanto, o imipenem é susceptível à degradação por uma enzima localizada nos túbulos renais denominada desidropeptidase-1 (DPH-1), levando à necessidade da administração de um inibidor da enzima DHP-1 associado ao fármaco, como a cilastatina. Além disso, *Enterococcus faecalis* apresenta sensibilidade ao imipenem e resistência aos outros carbapenên. O ertapenem não apresenta atividade terapêutica frente aos isolados clínicos de BGN não fermentadores. Doripenem foi inicialmente liberado nos Estados Unidos e na Europa em 2008, para o tratamento de infecções complicadas do trato urinário e intra-abdominais (CODJOE, DONKOR, 2018; LIMA et al., 2020).

O desenvolvimento de fármacos inibidores de betalactamases teve como objetivos a garantia e melhoria na eficácia da atividade de betalactâmicos. Estes fármacos, apresentam efeito maior frente às enzimas que são provenientes de codificação plasmidial. O ácido clavulânico e o subactam são os principais antimicrobianos da classe com aplicações clínicas. O primeiro é frequentemente utilizado em associação com amoxicilina para o tratamento de infecções urinárias, respiratórias, ginecológicas, do tecido subcutâneo e da pele, em especial por *Haemophilus* spp., estafilococos, coliformes e *Moraxella catarrhalis*. O segundo é usado associado à ampicilina no tratamento de infecções graves, oriundas de anaeróbios e Gram-negativos. Apresentando boa eficácia frente às cepas de *A. baumannii*, sendo considerado como opção terapêutica nos casos de meningite bacteriana causadas por esses microrganismos (CHU et al., 2013; FRATONI, NICOLAU, KUTI, 2021).

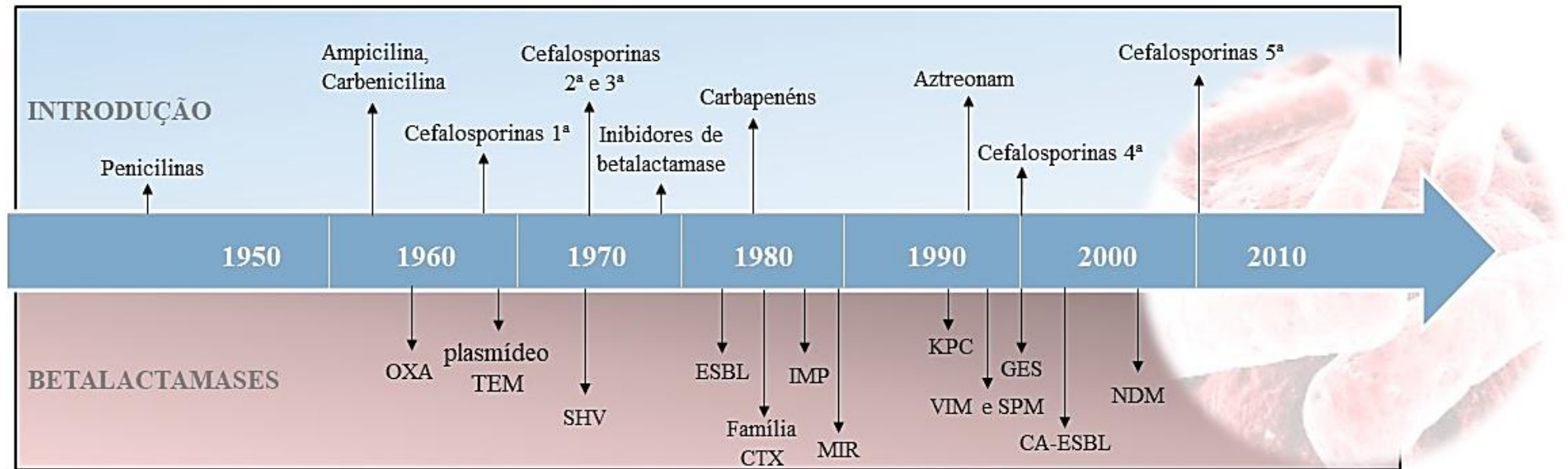
3.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS BETALACTAMASES

Betalactamases são enzimas capazes de inativar os antibióticos betalactâmicos sendo consideradas as principais causas de resistência a este conjunto de agentes antibacterianos (ROSA et al., 2021). A quantidade descrita de betalactamases naturais excede 1.300. O impacto clínico da prevalência de bactérias produtoras dessas enzimas é extensamente crítico, devido a dependência de cefalosporinas e carbapenêmicos para o tratamento de infecções graves, especialmente na saúde humana e animal. Além disso, o uso de antimicrobianos de maneira irracional tem impulsionado a evolução de patógenos produtores de betalactamases ao ponto em que múltiplos genes codificadores de betalactamases podem estar presentes em um único organismo, juntamente com determinantes de resistência para muitas outras classes antimicrobianas (Figura 3) (LIMA et al., 2020; BATRA et al., 2021).

Em 1940 foram identificadas as primeiras betalactamases, em cepas clínicas de *S. aureus*, logo após a introdução da Penicilina G na clínica médica, indicando assim, que o uso inadequado de betalactâmicos foi o ponto de partida para o surgimento de mutações ou transferência de genes que codificam novos tipos de betalactamases. As primeiras enzimas mutantes, SHV-2, foram isoladas em 1983, em isolados de *Klebsiella* spp. na Alemanha Ocidental. Nos BGNs é possível observar que o surgimento de novas variáveis dessas enzimas apresenta-se de formar simultânea a aplicação de novos betalactâmicos nas clínicas humana e animal (Figura 4) (LIMA et al., 2020; SANTOS et al., 2022).

Os critérios utilizados para classificar as betalactamases incluem o ponto isoelétrico, a massa molecular, a atividade apresentada pela enzima frente aos diferentes betalactâmicos e o perfil do substrato, interação com inibidores, a natureza do sítio de ação da enzima, sua sequência de aminoácidos e a estrutura tridimensional. Dessa forma, essas enzimas foram classificadas nas quatro classes de Ambler (A, B, C e D). A classe A engloba as serino-betalactamases; B: engloba as metalo-beta-lactamases, que necessitam de íons de zinco como co-fator; C: engloba as betalactamases cromossômicas do tipo AmpC e D: engloba as oxacilinasas (LIMA et al., 2020; FRATONI, NICOLAU, KUTI, 2021).

Figura 3. Relação entre a introdução da utilização de betalactâmicos e o surgimento das enzimas betalactamases.



Fonte: O autor (2022)

3.3.1 Classe A de Ambler

Entre as betalactamases que fazem parte dessa classe, são membros considerados importantes as: penicilinases, ESBLs e carbapenemases. São descritas mais de 600 variantes de ESBL, nas quais as derivadas das enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 apresentam grande importância devido a alta incidência em cepas de enterobactérias. Além disso, as enzimas do grupo CTX-M têm sido amplamente descritas em isolados de BGN. Organismos considerados com o fenótipo ESBL são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de terceira geração e o aztreonam. Os inibidores de betalactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, podem neutralizar os efeitos dessas enzimas, porém, existem estudos que reportam variantes de enzimas TEM e SHV que apresentam resistência a esses antimicrobianos (BELLO et al., 2018; TOOKE et al., 2019).

CTX-M foi reportada em amostras clínicas pela primeira vez na década de 90, em uma cepa de *Kluyvera* spp. considerada como colonizadora. Posteriormente, essa enzima foi detectada em diferentes espécies de enterobactérias. Desde a primeira descrição dessa enzima, foram reportados o surgimento de mais de 100 variantes, nas quais CTX-M-14 e CTX-M-15 apresentam maior prevalência. Elementos genéticos móveis que codificam essas enzimas estão frequentemente associados a determinantes genéticos de resistência aos aminoglicosídeos, sulfonamidas e fluorquinolonas, dificultando a escolha terapêutica (BELLO et al., 2018; SANTOS et al., 2022).

KPC, *Serratia marcescens* Enzima (SME), Não Metallo-enzima Carbapenamase (NMC), *imipenem-hidrolizing* Betalactamase (IMI) e Guiana betalactamases de Espectro-estendido (GES) são as enzimas betalactamases capazes de hidrolisar carbapenêmicos consideradas como pertencentes a classe A de Ambler. KPC é considerada a carbapenemase mais importante e mais prevalente no mundo todo, além disso, está associada a altas taxas de morbimortalidade em infecções hospitalares. São descritas mais de 70 variantes dessa enzima, nas quais a KPC-2 e KPC-3 são as mais comuns. Novos inibidores de enzimas betalactamases, como o avibactam, tem demonstrado boa atividade no tratamento de infecções causadas por cepas KPC positivas. As enzimas SME, IMI e NMC são codificadas no cromossomo das bactérias e estão associadas aos microrganismos no qual foram identificadas originalmente. A GES foi inicialmente descrita como uma enzima ESBL, porém, variantes dessa enzima possuem a capacidade de hidrolisar carbapenêmicos (BELLO et al., 2018; TOOKE et al., 2019; SANTOS et al., 2022).

3.3.2 Classe B de Ambler

É composta pelas metalo-beta-lactamases Imipenemase (IMP), Verona imipenemase (VIM), Germany imipenemase (GIM), Seul imipenemase (SIM) e São Paulo metalo-beta-lactamase (SPM) e New Delhi metalo-beta-lactamase (NDM). A última foi descrita no ano de 2009 em cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas de pacientes da Índia. Posteriormente, foram descritas cerca de 20 variantes de NDM por todo o mundo, estando amplamente distribuída na Europa, Ásia e América. SPM é descrita em isolados bacterianos do Brasil, sendo raro relatos dessa enzima em cepas de outros países, apresentando maior incidência em cepas de *P. aeruginosa*, na qual está associado a altas taxas de morbimortalidade no território brasileiro (COSTA-JÚNIOR et al., 2021; SANTOS et al., 2022).

As enzimas dessa classe não são susceptíveis a atividade de inibidores de betalactamases, são inibidas *in vitro* pelo EDTA, quelante de metais, e apresentam baixa atividade frente aos monobactâmicos. São diferenciadas das outras enzimas por possuírem um sítio de ligação do íon metálico Zinco, localizado na interface das duas folhas beta que compõem o núcleo da proteína. Esse íon é utilizado como cofator para a atividade enzimática (TOOKE et al., 2019).

3.3.3 Classe C de Ambler

As AmpC betalactamases são cefalosporinases que podem ser codificados em regiões do cromossomo ou em elementos genéticos móveis. Conferem resistência às cefalosporinas de terceira geração, penicilinas, aztreonam e aos inibidores de betalactamases. No entanto, não possuem atividade hidrolítica frente os carbapenêmicos e cefalosporinas de quarta geração. Essa classe inclui as enzimas Cefamicina (CMY), *Miram Hospital* (MIR), Moxalactam (MOX), Latamoxef (LAT), Cefoxitina (FOX), *Dhahran Hospital* (DHA), Tipo AmpC (ACT), Classe C de Ambler (ACC) e Enzima C. *freundii* (CFE) ((TOOKE et al., 2019; ROSA et al., 2021)

Os organismos do grupo CESP HaM (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp. *S. marcescens*, *Providencia* sp./*Proteus vulgaris*, *Hafnia alvei* e *Morganella morganii*), possuem os genes que codificam essas enzimas no cromossomo. Esses podem ser induzidos por meio da pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos. *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Proteus mirabilis* são espécies de microrganismos que foram reportados carreando plasmídeos com genes da enzima AmpC. A presença desses genes em

plasmídeos, frequentemente está associado a co-incidência com determinantes genéticos de resistência a aminoglicosídeos e tetraciclina (BELLO et al., 2018).

3.3.4 Classe D de Ambler

A classe é composta pelas enzimas Oxacilinases (OXAs) e são frequentemente detectadas nos BGN não fermentadores *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Essas enzimas podem estar relacionadas ao fenótipo de resistência ESBL (OXA-10-like, OXA-11, OXA-13, OXA14, OXA-16, OXA-17, OXA-19, OXA-28) e carbapenemases (OXA-23-like, OXA-40-like, OXA-48-like, OXA-51-like, OXA-58-like e OXA-143-like), de acordo com a variante OXA presente. Algumas variantes podem estar associadas à resistência apenas a penicilinas e outras podem apresentar resistência às cefalosporinas de terceira e quarta geração e aos carbapenéns. São descritas mais de 140 variantes de betalactamases do tipo OXA. OXA-48 é a principal variante encontrada em espécies de enterobactérias e apresenta distribuição mundial. Inibidores de betalactamases apresentam fraca atividade frente microrganismos produtores dessas enzimas.

3.4 POLIMIXINAS: UMA VISÃO GERAL

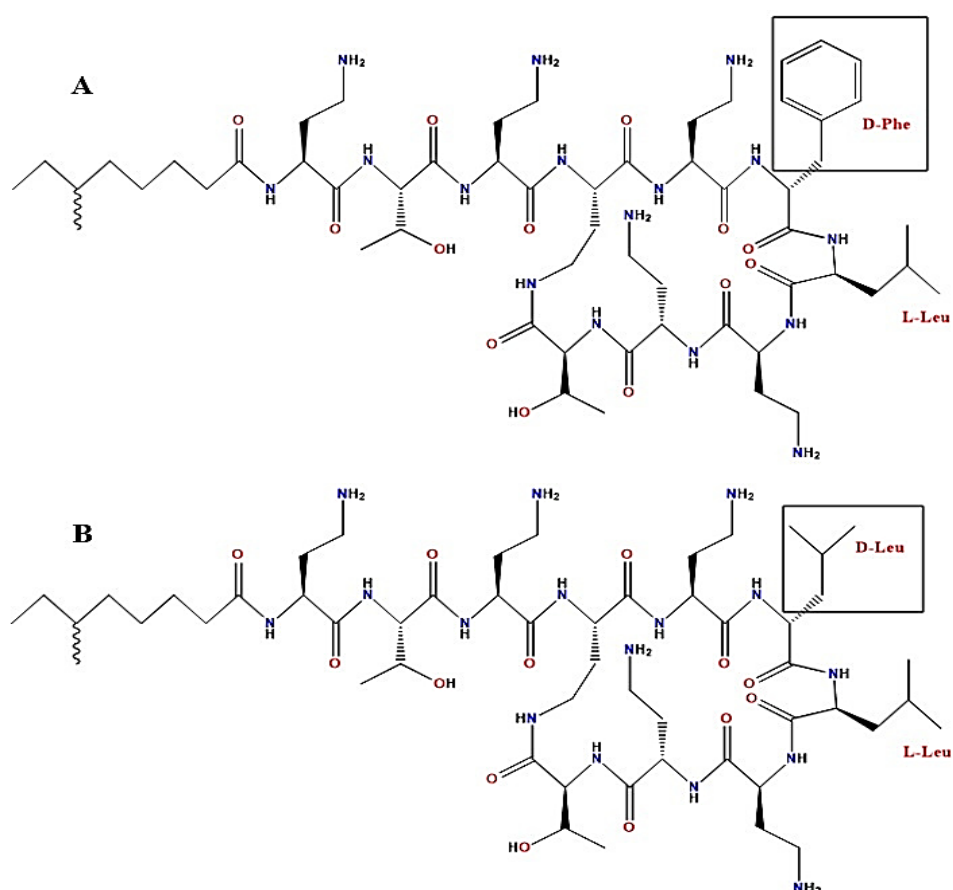
É essencial que os antibióticos penetrem nas barreiras anfifílicas bacterianas, permitindo que o seu componente ativo entre na célula. Os antibióticos cíclicos têm essa capacidade de interagir com as membranas bacterianas. Neste contexto, os compostos constituintes desta classe têm sido utilizados na linha de frente contra infecções causadas por isolados MDR Gram-negativos (ZAYASCKI et al., 2007; VELKOV et al., 2010).

As polimixinas foram descobertas na década de 1940 e introduzidas na prática clínica no final da década de 1950. Porém, sua utilização como opção terapêutica foi interrompida devido à alta toxicidade que esses antimicrobianos apresentavam. No final do século XX, com a emergência da disseminação de cepas MDR de bacilos Gram-negativos e a ausência de antimicrobianos eficazes no tratamento de infecções causadas por essas bactérias, antimicrobianos antigos, como as polimixinas B e E, foram reconsiderados como opções de tratamento (GIRARDELLO, GALES, 2012; ROBERTS et al., 2015; SRINIVAS, RIVARD, 2017).

A polimixina foi inicialmente obtida do microrganismo *Paenibacillus polymyxa*. Sua estrutura química é composta por um núcleo decapeptídeo que contém um ciclo intramolecular de heptapeptídeos ligados por ligações do tipo amida entre o grupo amino

da cadeia lateral do resíduo de ácido diamino butírico (Dab) na posição 4 e o grupo carboxila na C-treonina terminal de resíduos. Outra característica estrutural importante da cadeia de polimixina é a presença de cinco resíduos Dab não proteinogênicos, que são carregados positivamente em pH fisiológico, resíduos hidrofóbicos e um grupo acil N-terminal. Essa classe de antimicrobianos é formada por um grupo de cinco compostos (A, B, C, D e E), que diferem em termos de sequências de aminoácidos e cadeias laterais de ácidos graxos (MARTIN et al., 2003; COSTA-JÚNIOR et al., 2020). As estruturas químicas das polimixinas B e E (colistina) diferem pela presença do aminoácido D-leucina na molécula de colistina e D-fenilalanina na molécula de polimixina B (Figura 4) (FALAGAS et al., 2010; COSTA-JÚNIOR et al., 2020).

Figura 4. Estrutura química das polimixinas. Em (A) a polimixina B, em (B) a colistina.



Fonte: COSTA-JUNIOR et al. (2022).

As polimixinas atuam ligando-se a moléculas de lipopolissacarídeo (LPS) e

fosfolipídios encontrados na membrana externa de bactérias gram-negativas. Esse processo resulta em uma alteração na parede celular do microrganismo, levando ao extravasamento do conteúdo intracelular e, conseqüentemente, à morte da bactéria (NIKOO et al., 2017). Devido à interação eletrostática das moléculas antimicrobianas com o grupo fosfato do lipídio A da membrana bacteriana, as polimixinas apresentam maior afinidade pelo LPS bacteriano quando comparadas aos cátions magnésio e cálcio, que por sua vez, estão relacionados ao processo de estabilização do LPS. Essa interação provoca um deslocamento dos íons cálcio e magnésio, permitindo assim a ligação do princípio ativo à membrana do microrganismo, resultando em um desarranjo na membrana e, posteriormente, no aumento da absorção do antibiótico, o que leva à desequilíbrio osmótico, causando morte celular (VELKOV et al., 2013).

Entre os outros mecanismos de ação das polimixinas estão a inibição de enzimas essenciais para a respiração celular em bactérias, como a NADH-quinona oxidoredutase tipo II. No entanto, foi relatado que a susceptibilidade à polimixina diminuiu, bem como houve um aumento nas infecções causadas por patógenos Gram-negativos resistentes à polimixina. A resistência à polimixina foi observada principalmente em isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli*. Assim, a eficácia clínica desta classe de antimicrobianos tornou-se limitada quando usada como monoterapia (MAALEJ et al., 2012; ROSSI et al., 2017).

3.5 RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS

As polimixinas não possuem atividade contra bactérias anaeróbias e Gram-positivas, devido ao fato desses microrganismos não possuírem LPS na membrana celular externa. Além disso, diversas bactérias Gram-negativas são intrinsicamente resistentes às polimixinas, incluindo *Brucella* spp., Complexo *Burkholderia cepacia*, *Edwardsiella* spp., *Morganella morganii*, *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Serratia* spp. A resistência natural desses microrganismos a essa classe de antimicrobianos é devido a alterações constitutivas da expressão gênica que resulta na adição de moléculas catiônicas no LPS presente na membrana externa dessas bactérias, resultando na diminuição da afinidade de ligação das polimixinas no local de ação (YAHAV et al., 2012; BARON et al., 2016).

Os mecanismos de resistência às polimixinas podem ocorrer por meio de mutação, adaptação ou através da aquisição de plasmídeo carregando genes de resistência (GIRARDELLO, Gales, 2012; LESCAT et al., 2019). Estudos demonstram três fenótipos de resistência às polimixinas como sendo os frequentemente observados. O primeiro,

denominado de resistência natural, relacionado às mutações no genoma do microrganismo e promove valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) próximos aos considerados como ponto de corte de resistência. O segundo, é decorrente do processo de adaptação bacteriano ocasionado pela pressão seletiva exercida pela exposição a concentrações subinibitórias do fármaco. No caso do fenótipo decorrente da adaptação bacteriana, os valores de CIM podem ser mais elevados, sendo descritos acima de 128 µg/mL em alguns estudos. Além disso, a resistência mediada pela aquisição de elementos genéticos móveis, como o *mcr*, no qual é transferível por meio de plasmídeos entre bactérias (GIRARDELLO, GALES, 2012; BARON et al., 2016; SRINIVAS, RIVARD, 2017).

Entre os mecanismos pelo qual os patógenos Gram-negativos se tornam resistentes às polimixinas, existe uma modificação química da membrana externa bacteriana (KAYE et al., 2016). Essas modificações são mediadas por dois componentes, PhoP/Q e PmrA/B, que regulam a resistência alterando a carga catiônica e o padrão iônico da membrana externa, levando a uma diminuição da carga aniônica e, conseqüentemente, impedindo a interação eletrostática de a célula bacteriana com moléculas de droga (TRIMBLE et al., 2016).

A regulação do gene resulta na modificação do LPS que leva à resistência. Essa regulação é mediada por sistemas enzimáticos de dois componentes (TCS) que geralmente regulam fatores de resistência e virulência (GIRARDELLO et al., 2012; COSTA-JÚNIOR et al., 2020). A ação dos sistemas de bomba de efluxo, alterações nas concentrações de proteínas da membrana externa (porinas) e espessamento da cápsula polissacarídica também são extremamente importantes para o desenvolvimento da resistência do patógeno às polimixinas entre os constituintes da ordem Enterobacterales (TRIMBLE et al., 2016).

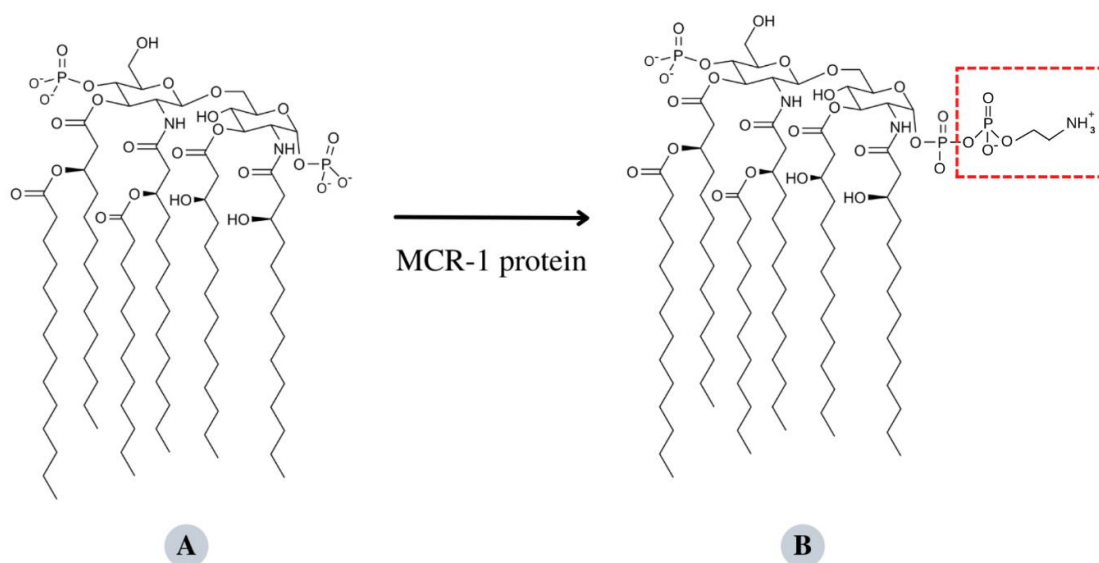
Além da resistência mediada por mutações envolvendo TCSs, o mecanismo codificado por um gene de localização plasmidial, *mcr-1*, descrito na China em 2015 (LIU et al., 2016), tornou-se a principal causa de resistência à polimixina. Existem dois tipos de alterações químicas na membrana externa de bacilos Gram-negativos associadas à resistência às polimixinas, uma das principais é a adição de 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) no componente lipídico A do LPS. Outra forma é a adição de fosfoetanolamina (PEA) ao grupo 1-(4')-fosfato do lipídio A, promovendo resistência intrínseca às polimixinas (MILLER et al., 2011; COSTA-JÚNIOR et al., 2020).

3.6 RESISTÊNCIA A COLISTINA MEDIADA POR PLASMÍDEO (MCR)

MCR-1 é descrito como lipase A-40-PEA-transferase. Esta família de fosfatases alcalinas catalisa a ligação da fosfatidiletanolamina (PEA) ao LPS lipídio A e, consequentemente, leva à resistência à colistina. Assim, a resistência transferível à polimixina está relacionada à adição de PEA ao LPS lipídio A pelo MCR-1. Além disso, a localização do gene *mcr* nos plasmídeos favorece a rápida propagação por conjugação, especialmente em isolados de *E. coli* (Figura 5). A presença deste gene em uma variedade de plasmídeos destaca sua capacidade de disseminação (LIU et al., 2016; JEANNOT et al., 2017; XU et al., 2018).

Jeannot et al. (2017) destacaram a transferência interespecie de genes móveis como um fator responsável pela disseminação progressiva de genes de resistência. Adicionalmente, foi observado o mecanismo intrínseco e as taxas de resistência à polimixina em *Enterobacteriaceae* isolados de *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Em seu estudo, Jeannot et al., (2017) confirmaram que os genes *mcr* estão localizados no plasmídeo transferível, o que, por sua vez, representa um alto fator de propagação por conjugação.

Figura 5. Atividade da MCR na ligação da fosfatidiletanolamina (PEA) ao LPS do lipídio A. Em (A) a molécula de lipídio A e em (B) o lipídio A após a ação da enzima MCR-1



Fonte: O autor (2022)

De acordo com os estudos presentes na plataforma *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), 10 variantes do gene *mcr* foram descritas até outubro do ano de 2022, em várias espécies de microrganismos (Tabela 1). O gene *mcr-1* tem 13 sub-variantes, a maioria das quais foi relatada em isolados de *E. coli* (Di PILATO et al., 2016). As variantes já descritas podem ser encontradas em diferentes classes de plasmídeos, caracterizando uma diversidade de reservatórios gênicos. IncI2, IncHI2 e IncX4 são descritos como os principais grupos de plasmídeos responsáveis por carrear genes de resistência. Existem muitos estudos que descrevem a disseminação da resistência à colistina relacionada a várias variantes do gene, locais, tipos de amostras analisadas, espécies de isolados e tipo de plasmídeos transportadores (NANG et al., 2019; KOBS et al., 2020). A investigação da resistência a essa classe de antibiótico pode ser melhor explorada em dois artigos de revisão apresentados no tópico resultados desta tese.

Tabela 1. Variantes do gene *mcr* envolvidas na resistência à polimixina, ano, localização, plasmídeo e origem da amostra biológica.

gene <i>mcr</i>	Espécies	Genes de β -lactamases	CIM de Colistina (mg/L)	Origem	Ano *	País	Referências
<i>mcr -1</i>	<i>E. coli</i>	ND**	8	Animal, Humano e Comida	2015	China	Liu et al. (2016)
<i>mcr -2</i>	<i>E. coli</i>	ND**	4-8	Animal	2011-2012	Bélgica	Xavier et al. (2016)
<i>mcr -3</i>	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{OXA-1}	8	Animal	2015	China	Yin et al. (2017)
<i>mcr -4</i>	<i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.	ND**	8	Animal	2016-2017	Itália , Espanha e Bélgica	Carretto et al. (2018)
<i>mcr -5</i>	<i>Salmonella</i> entérica	<i>bla</i> _{TEM -1b}	4-8	Animais, Alimentos	2011-2013	Alemanha	Borowiak et al. (2017)
<i>mcr -6</i>	<i>Moraxela pluranimalium</i>	<i>bla</i> _{BRO-1}	2-4	Animal	2014-2015	Reino Unido	AbuOun et al (2017)
<i>mcr -7,1</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{SHV-28} ; <i>bla</i> _{CTX-M-55}	4	Animal	2014	China	Yang et al. (2018)
<i>mcr -8</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{SHV-1} ; <i>bla</i> _{NDM-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-14} ; <i>bla</i> _{NDM-5}	16	Animal	2015-2017	China	Wang et al. (2018)
<i>mcr -9</i>	<i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium	<i>bla</i> _{TEM -1B} ; <i>bla</i> _{SHV -12}	5	Humano	2010	EUA	Carroll et al. (2019)
<i>mcr -10</i>	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	<i>bla</i> _{MIR -5}	2	Humano	2016	China	Wang et al. (2020)

*Ano do primeiro isolamento do gene.

**ND: Não detectado.

Fonte: O autor (2022).

3.7 BIOFILME

São formados a partir de comunidades biológicas estruturadas, coordenadas e funcionais de microrganismos, capazes de produzir uma matriz polimérica, na qual encontram-se imersas. O biofilme promove uma barreira protetora entre as bactérias e o ambiente, atuando como um importante fator de virulência, atribuindo às cepas bacterianas resistência aos antimicrobianos e imunidade do hospedeiro. As bactérias da espécie *E. coli* frequentemente são capazes de produzir biofilme e estão associadas às infecções humanas e animais (COSTA-JÚNIOR et al., 2018).

São reportadas diversas espécies de microrganismos capazes de produzir biofilmes, em bactérias patogênicas de infecções hospitalares, infecções comunitárias, colonizadoras e ambientais. Em microrganismos isolados de hospitais apresentam maior prevalência em amostras de superfícies de dispositivos médicos e tecidos vivos, como válvulas cardíacas, pulmões e esmalte dentário. Em cepas de *E. coli*, a capacidade de produção de biofilme é principalmente relacionada com microrganismos causadores de infecções do trato urinário, da próstata e isolados de cateteres venosos centrais (ALAV, SUTTON, RAHMAN, 2018; COSTA-JÚNIOR et al., 2018).

A formação dos biofilmes bacterianos ocorre em três estágios: aderência e colonização, formação da matriz e maturação. A formação inicial do biofilme ocorre a partir da adesão das cepas bacterianas à superfície e dividem-se para a formação das microcolônias. Estas se fundem em grandes agregados, deixando canais abertos para permitir a passagem de fluidos contendo nutrientes. À medida que o biofilme envelhece, as células sésseis tornam-se cobertas com a matriz polimérica e exopolissacarídica, comportando-se como barreira de difusão contra agentes antibacterianos, células fagocitárias e componentes do sistema complemento (ALAV, SUTTON, RAHMAN, 2018; SAIPRIYA et al., 2020).

Os biofilmes possuem como componente essencial o processo de resposta a sinalizações extracelulares denominado de *Quorum Sensing* (QS). Esse é o modo de comunicação entre as células bacterianas dentro do biofilme, via moléculas de sinal conhecidas como “autoindutores”, que são produzidas pelas bactérias ao longo do seu crescimento e são responsáveis pela definição das características fenotípicas e genotípicas do biofilme. Essa comunicação célula a célula é dependente da densidade celular e auxilia na adaptação bacteriana às mudanças em vários fatores ambientais, tais como temperatura, nível de oxigênio, acidez e a qualidade do meio de crescimento (EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018; SAIPRIYA et al., 2020). Dessa forma, o biofilme proporciona o ambiente ideal para

troca de materiais genéticos e comunicação entre os microrganismos. As taxas de transferências genéticas em biofilmes apresentam ordens de magnitudes elevadas quando comparadas as taxas entre as células de vida livre, conseqüentemente, há o aumento da resistência a antimicrobianos, sanitizantes e detergentes. A matrix polissacarídica pode aumentar em até 1000 vezes os valores de CIM da bactéria (SAUER et al., 2022).

O tratamento de infecções causadas por cepas produtores de biofilmes tornou-se um desafio em virtude da ausência de fármacos eficazes com atividade antibiofilme. Frequentemente, exigem-se altas doses de antimicrobianos comerciais como opções terapêuticas frente esses microrganismos, porém o uso de altas doses dos fármacos convencionais pode levar a efeitos adversos prejudiciais à saúde do paciente (ALAV, SUTTON, RAHMAN, 2018).

Além do declínio na produção de novos agentes antimicrobianos, a propagação de cepas MDR em ambientes hospitalares e na comunidade é cada vez maior. Abordagens de epidemiologia molecular e análise de disseminação da RAM no ambiente e na saúde humana e animal, utilizando microrganismos marcadores, surgem como ferramentas de controle, cujo o objetivo é proporcionar melhorias na saúde pública e segurança do paciente. O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva para o desenvolvimento de novos antimicrobianos no futuro ainda é incerta (COSTA-JÚNIOR et al., 2018; COSTA-JÚNIOR et al., 2022; SAUER et al., 2022).

3.8 A IMPORTÂNCIA DAS ANÁLISES DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

A introdução do termo “epidemiologia molecular” ocorreu no ano de 1973, com a publicação do artigo “Epidemiologia Molecular da Influenza” (HONARDOOST, RAJABPOUR, VAKILI, 2018). Esse termo formalizou-se com os avanços das pesquisas moleculares voltadas para a detecções de biomarcadores e estratégias epidemiológicas. Posteriormente, as análises de epidemiologia molecular foram incluídas como ferramentas especiais para estudar alguns fatores biológicos como perfil de proteínas, metabólitos ou até mesmo novos genes em organismos causadores de processos infecciosos ou em pacientes. Esta ciência facilita a detecção da etiologia das doenças e a prevenção da incidência dessas, direcionando para melhorias nas condições de saúde pública. Essa linha de pesquisa, é considerada para a comunidade científica como uma oportunidade de entender os mecanismos precisos das doenças e fazer recomendações de saúde pública para prevenção e tratamento de doenças (VINEIS; et al., 2007; ZHEBRUN, 2014; HONARDOOST, RAJABPOUR, VAKILI, 2018).

Em 2003, com a conclusão do sequenciamento completo do genoma humano, houve um grande avanço nesse campo, no qual foi evidenciado o quanto as tecnologias de alto rendimento, como as abordagens de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), ampliam a compreensão da associação fenótipo-genótipo das doenças e auxiliam nas buscas por biomarcadores de doenças, reconhecendo a necessidade do uso dessas tecnologias para a compreensão dos mecanismos fundamentais de enfermidades nas populações (VINEIS; et al., 2007; ZHEBRUN, 2014).

Dentro da área de epidemiologia molecular, destaca-se a tipagem molecular de microrganismos como uma metodologia importante para a compreensão da dinâmica de disseminação de bactérias e da RAM. Com isso, diversas técnicas foram elaboradas com o intuito de definir a relação clonal de cepas de uma mesma espécie. Com o avanço da tecnologia na área de biológica molecular, essas técnicas foram aprimoradas com o objetivo de resultados rápidos e precisos das relações entre microrganismos. Entre as metodologias aplicadas a essa abordagem nas cepas bacterianas, destacam-se a *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction* (ERIC-PCR), *Repetitive extragenic palindrome* (REP-PCR), ribotipagem, *Pulsed-field Gel Eletrophoresis* (PFGE), sequenciamento do gene rRNA 16S, *Multilocus Sequencing Type* (MLST) e *Multilocus Variable Number Tandem Analysis* (MLVA). Além disso, esses métodos receberam, ao longo do tempo, adaptações de acordo com o microrganismo utilizado como objeto e o tipo de análise (COSTA-JÚNIOR et al., 2021; FUGA et al., 2022; BELTRÃO et al., 2022).

A técnica de ERIC-PCR é amplamente utilizada para a detecção da relação clonal entre espécies de Enterobactérias e bacilos Gram-negativos não fermentadores. Em cepas de *E. coli* observou-se boa eficácia na determinação da clonalidade (DUAN et al., 2009; JACOMÉ et al., 2016; ARÁUJO-LIMA et al., 2020; COSTA-JÚNIOR et al., 2021).

3.9 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma espécie bacteriana pertencente a Ordem Enterobacterales, Família *Enterobacteriaceae*. São caracterizadas pela morfologia em formato de bastonetes curtos e apresentam-se como Gram-negativos pelo método de coloração de Gram. Podem crescer em aerobiose ou anaerobiose e utilizam fontes simples para obtenção de carbono e nitrogênio e não são capazes de formar esporos. A bactéria é a espécie mais importante do gênero *Escherichia*, e são consideradas como motilidade variável, sendo mais incidentes a presença de cepas móveis, através de flagelos peritríquios (DENAMUR et al., 2021).

Essa bactéria, é considerada um membro comensal da microbiota intestinal de organismos vertebrados endotérmicos, colonizando-os poucas horas após seu nascimento, além de um patógeno oportunista de mamíferos e aves. O termo utilizado para designar infecções que são causadas pela bactéria *E. coli* são colibaciloses. Essa bacteriose afeta diversas espécies de animais, como bezerros, aves e porcos, sendo considerada a principal infecção bacteriana em aves e uma das mais prevalentes em bovinos (COSTA-JÚNIOR et al., 2018; DENAMUR et al., 2021). No entanto, apesar de ter como *habitat* natural o trato intestinal de homens e de animais, cepas desse microrganismo possuem alta dispersão no ambiente, no qual pode estar associada a contaminação de águas rios e mares através do despejo de esgoto não tratado (COSTA-JÚNIOR et al., 2018; CORDEIRO-MOURA et al., 2022).

Os grupos de cepas que compartilham atributos de virulência e que estão envolvidos em doenças de mesma natureza, denominados, patótipos, são utilizados para classificar as cepas de *E. coli*. Inicialmente, esses grupos são divididos em duas linhagens, de acordo com o sítio da infecção: diarreiogênica, que causam infecções intestinais (InPEC); e o grupo composto por linhagens causadoras de infecções extra intestinais (ExPEC), que ocasionam um amplo espectro de doenças fora do ambiente intestinal (COSTA-JÚNIOR et al., 2018; RAEISPOUR, RANJBA, 2018).

No grupo diarreiogênico, os patótipos estão definidos pela expressão de fatores de virulência e são subdivididos nas classes: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC). Os patótipos das ExPEC, além da expressão de fatores de virulência, são considerados características genótípicas e fenótípicas como critério de classificação, podendo ser divididos em *E. coli* uropatogênicas (UPEC), *E. coli* associada a meningite neonatal (NMEC), *E. coli* septicêmica (SEPEC) e *E. coli* patogênica para aves (APEC) (PITOUT, 2012; RAEISPOUR, RANJBA, 2018).

Os diferentes patótipos dessa bactéria são caracterizados por apresentarem os antígenos O, presente no lipopolissacarídeo (LPS), e antígeno H, presente nos flagelos, que permitem diferenciar os sorótipos e sorogrupos dos patótipos, permitindo a definição desses por métodos sorológicos no diagnóstico laboratorial (NATARO; KAPER, 1998).

Em humanos, fora do seu *habitat* natural é comum que este microrganismo seja capaz de causar diversas doenças. *E. coli* é o membro da família *Enterobacteriaceae* corriqueiramente isolado em amostras clínicas de pacientes com ITUs. Apesar de geralmente

não estarem associadas a infecções na grande maioria dos pacientes, porém, em pacientes imunocomprometidos esta espécie pode representar um problema clinicamente relevante. Além das ITUs, estes podem causar infecções intra-abdominais, pulmonares, da pele, de tecidos moles, meningite neonatal e sepse, além de infecções intestinais, que incluem várias formas de diarreia, síndrome hemolítica e urêmica (MURRAY, 2018, LAMBRECHT et al., 2019; CORDEIRO-MOURA et al., 2022).

A UPEC está associada a aproximadamente 90% dos casos de ITUs em mulheres. Além disso, fatores de virulência são importantes alvos de estudos em ITUs graves, devido ao maior grau de patogenicidade da cepa e capacidade de transmissão relacionada aos mesmos. Alguns desses fatores são: aerobactina (aer), fímbrias P (pap), hemolisina (hly), fímbrias tipo 1, adesina I afimbrial (afa I), fator citotóxico necrosante 1 (cnf 1) fímbrias S (sfa) e adesinas, que estão relacionadas ao processo de formação do biofilme (JAHANDEH et al., 2015; LAMBRECHT et al., 2019).

A incidência de InPEC e ExPEC está aumentando em humanos. Além disso, a alta prevalência de *E. coli* resistente aos antimicrobianos fez desse microrganismo o terceiro lugar na lista dos 12 patógenos prioritários resistentes à antibióticos descritos pela OMS (Tabela 2). As cepas desse microrganismo consideradas como colonizadoras, que vivem em relação de comensalismo, são apontadas como principais disseminadoras de RAM horizontal por meio de elementos genéticos móveis (PITOUT, 2012; ASOKAN et al., 2019). *E. coli* são caracterizadas por apresentarem resistência intrínseca a alguns antibióticos. Porém, possuem facilidade de aquisição dos genes de resistência a aminoglicosídeos, betalactâmicos e fluorquinolonas (BLAIR et al., 2014; CORDEIRO-MOURA et al., 2022).

Tabela 2. Patógenos de prioridade global segundo a OMS.

Categoria de prioridade	Microrganismo	RAM	Coloração de Gram
Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenêmicos	Gram-negativo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenêmicos	Gram-negativo
	Ordem Enterobacterales	Carbapenêmicos	Gram-negativo
	<i>Klebsiella pneumonia</i>		Gram-negativo
	<i>Escherichia coli</i>		Gram-negativo
	<i>Enterobacter</i> spp.		Gram-negativo
	<i>Serratia</i> spp.	Cefalosporinas de terceira-geração	Gram-negativo
	<i>Proteus</i> spp.		Gram-negativo
	<i>Providencia</i> spp.		Gram-negativo
	<i>Morganella</i> spp		Gram-negativo
Alta	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina	Gram-positivo
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina	Gram-positivo
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina	Gram-negativo
	<i>Campylobacter</i>	Fluorquinolonas	Gram-negativo
	<i>Salmonella</i> spp.	Fluorquinolonas	Gram-negativo
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporinas de terceira-geração e fluorquinolonas	Gram-negativo
Média	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina	Gram-positivo
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina	Gram-negativo
	<i>Shigella</i> spp.	Fluorquinolonas	Gram-negativo

RAM: Resistência Antimicrobiana

Fonte: Adaptado de ASOKAN et al (2019).

3.10 INETRAÇÃO ENTRE HUMANOS E ANIMAIS

A relação entre a saúde animal e a saúde pública pode ser evidenciada por meio do compartilhamento do mesmo ambiente, nos quais tornam esses organismos sensíveis a patógenos semelhantes, denominados zoonóticos. Além disso, a maioria das vezes, ambos os organismos, animais e humanos, são tratados com os mesmos medicamentos. Assim, o desenvolvimento de RAM desempenha um papel importante na relação entre esses seres vivos (WELLS, 2019; OVERGAAUW et al., 2020)

Até a década de 1960, os animais de companhia eram mantidos como animais de

utilidade, como cães de guarda, ou para controle de pragas, no caso dos gatos. Devido às grandes mudanças, como aumento do tempo de lazer e prosperidade, e os processos de isolamento e individualização dos seres humanos, os animais começaram a serem mantidos como de estimação e são atualmente considerados por muitos proprietários como um membro valioso da família. Existem vários aspectos relacionados a manutenção da relação de convivência íntima entre animais e humanos, entre eles o companheirismo, valor emocional e socialização. Porém, é importante enfatizar o risco de transmissão de doenças entre esses organismos (FERNANDES et al., 2018; WELLS, 2019).

Estudo de revisão relatou que a maioria dos patógenos associados a zoonoses são bacterianos, como por exemplo *E. coli* (FERNANDES et al., 2018). Além disso, *Mycobacterium* spp. representou o principal patógeno compartilhado entre humanos e animais selvagens e o *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) com os animais de companhia (FERNANDES et al., 2018; OVERGAAUW et al., 2020). É importante destacar a possibilidade da transmissão de clones de bactérias produtoras de ESBL, incluindo *E. coli*, *Enterobacter cloacae* e *K. pneumoniae* (SILVA et al., 2021; FREIRE et al., 2022). Além disso, estudo reportou a transmissão de *E. coli* produtora de NDM-5, resistente aos carbapenêns, de humanos previamente hospitalizados para cães (SANDOE et al., 2014; OVERGAAUW et al., 2020).

O processo de globalização e o aumento da urbanização acarretado pela revolução industrial, culminou no aumento das extensões de centro urbanos. Essa expansão urbana está relacionada à diversos impactos ambientais, como por exemplo: a diminuição dos mananciais, extinção de espécies, inundações, erosões, poluição, mudanças climáticas, destruição da camada de ozônio, chuva ácida, agravamento do efeito estufa e destruição de *habitats* de animais silvestres. Dessa forma, houve aumento no compartilhamento do ambiente entre humanos e animais (WELLS, 2019; OVERGAAUW et al., 2020). Entre esses animais que sofreram esse efeito antropogênicos pode-se destacar as aves de rapina (SILVA et al., 2016; SILVA et al., 2020).

As aves são reservatórios de microrganismos causadores de doenças zoonóticas, nas quais consideram-se os mais importantes deles os vírus da gripe aviária A. Estes circulam em aves selvagens sem sinais de doença e ao entrarem no sistema de produção avícola podem se tornar altamente patogênicos causando severa morbidade e mortalidade. Porém, nos últimos anos, estudos demonstraram que esses animais possuem um papel importante na disseminação de clones bacterianos e da RAM (SILVA et al., 2020; SILVA et al., 2021; FREIRE et al., 2022)

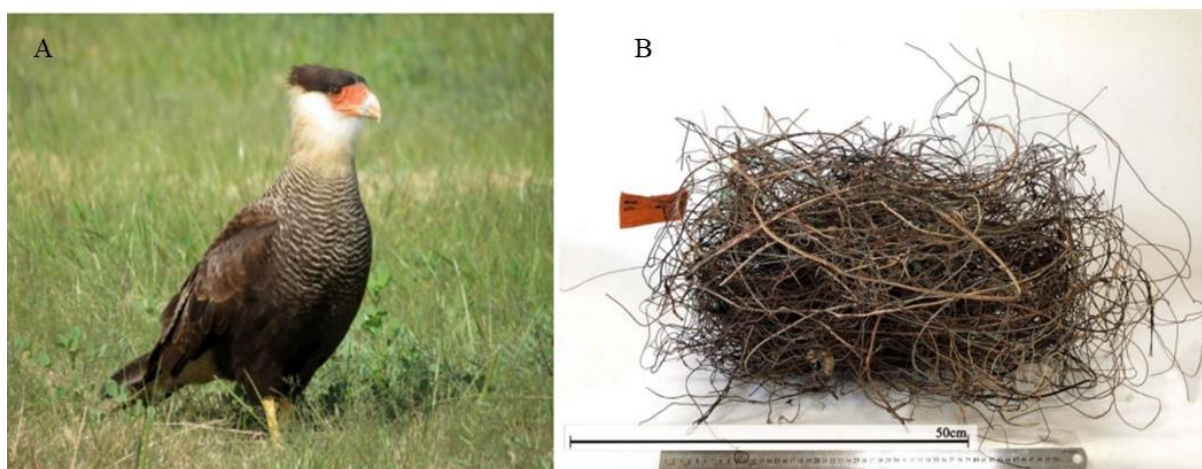
3.11 *Caracara plancus*: UMA AVE DE RAPINA COMUM NO BRASIL

O Carcará, pertence ao filo Chordata, classe Aves, ordem Falconiformes, família *Falconidae*, gênero *Caracara* e espécie *Caracara plancus*. Essa ave, encontra-se distribuída na América-latina principalmente em Argentina, Bolívia, Chile, Peru, Uruguai e em muitos estados do território brasileiro (SILVA et al., 2020). Sua coloração é predominantemente parda, realçada por um penacho de penas negras na cabeça, característica marcante da espécie, e seu peso é cerca de 834 gramas, possuindo aproximadamente 56 cm de comprimento, com envergadura de 120 cm a 130 cm (Figura 6A) (FRANZO et al., 2009; MCKINNEY, 2009; LIMA et al., 2022). A plumagem do animal jovem é diferenciada do adulto, por meio da ausência da coloração listrada padrão no peito. Além disso, possuem coloração clara com riscas longitudinais mais escuras no peito e na cabeça. Como critério de diferenciação da subespécie *Caracara cheriway*, é observado a diferença de tonalidade, mais clara, na base de sua cauda (OLIVEIRA et al., 2019).

O Carcará é uma ave de rapina campestre, que habita campos abertos, cerrados, beiras de estradas a procura de alimento, incluindo também centros urbanos (OLIVEIRA et al., 2019; SILVA et al., 2020). Alimenta-se principalmente de anfíbios, répteis, anelídeos, outras aves e pequenos vertebrados, além da carne de animais mortos. A carniça, pode estar associada a até 40% da sua alimentação. Essas aves, geralmente, se apropriam de ninhos existentes, construídos por outras espécies, para pôr seus ovos. Os ninhos desses animais, possuem características homogenias e geralmente são construídos em árvores. Além disso, estudo verificou a existência da construção de ninhos de carcará utilizando estruturas antropogênicas no centro de uma cidade, ilustrando o seu comportamento adaptativo dentro dos ambientes urbanos (Figura 6B) (LIMA et al., 2022).

Entre as causas mais comuns de morbimortalidade desses animais, estão as doenças infecto parasitárias. Além de serem acometidos por infecções causadas por esses microrganismos, essas aves, podem ser consideradas como potenciais reservatórios e disseminadores de bactérias, devido sua capacidade migratória (SILVA et al., 2020; LIMA et al., 2022).

Figura 6: Em (A) a ave de rapina Carcará, em (B) um ninho desse animal medindo cerca de 50 cm de diâmetro.



Fonte: Adaptado de Silva et al. (2020) e Lima et al. (2022).

Estudos relataram a presença de cepas de *S. aureus*, estafilococos coagulase-negativo e enterobactérias, como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., e *Shigella* spp., em diferentes sítios anatômicos de aves silvestres (SILVA et al., 2016; VIDAL et al., 2017). A detecção das bactérias da ordem Enterobacterales nesses animais pode ser considerada como um grande problema de saúde pública, pelo potencial zoonótico desses microrganismos. Além disso, foram reportadas bactérias Gram-negativas multidroga-resistentes (MDR) e produtoras de biofilme nesses animais (SILVA et al., 2016). Silva et al., (2020) descreveram a presença de oito cepas ESBL, entre 27 enterobactérias, das quais quatro foram identificadas como *E. coli*, sendo duas classificadas como moderadamente produtoras de biofilme.

3.12 CONTAMINANTES DO LEITE BOVINO

O leite é um fluido secretado por fêmeas mamíferas visando atender as necessidades nutricionais de indivíduos neonatos, sendo considerado como fonte de lipídeos, lactose, aminoácidos essenciais, aminoácidos necessários para a biossíntese de aminoácidos não essenciais, ácidos graxos essenciais, vitaminas, elementos inorgânicos, fatores de imunização para sobrevivência do neonato e água (KANTIANI et al., 2009; VIDA et al., 2017; CALAHORRANO-MORENO et al., 2022).

O leite bovino é o produto alimentar mais consumido no mundo, representando cerca de 48% do total de leite consumido. Porém, a coleta inadequada e o processamento desse

fluido para o procedimento de distribuição expõem este a resíduos de pesticidas, metais, micotoxinas, microrganismos ambientais, fatores de crescimento e outros contaminantes que chegam à vaca por meio da alimentação ou administração de medicamentos pelos produtores. Dessa forma, é possível afirmar que o leite bovino pode conter matérias de origem química ou biológica prejudiciais à vida humana e animal (ALEGBELEYE et al., 2018; CALAHORRANO-MORENO et al., 2022).

Diante disso, o processo de pasteurização foi implementado na indústria alimentícia como um método antimicrobiano, com o objetivo de contribuir para a redução do risco de aquisição de doenças causadas por microrganismos devido a ingestão de leite contaminado. Porém, ainda são relatados diversos episódios de processos infecciosos em indivíduos após consumo de leite pasteurizado (DE OLIVEIRA et al., 2015; VIDA et al., 2017; CALAHORRANO-MORENO et al., 2022). Esses episódios podem estar associados a uma população exagerada de microrganismos nos leites, que aumentam a capacidade de sobrevivência de patógenos após a pasteurização (DE OLIVEIRA et al., 2015; VIDAL et al., 2017).

A contaminação química do leite advém da aplicação de agroquímicos, uso de produtos veterinários legais ou ilegais, rações e forragens contaminadas com toxinas naturais e uso indevido de produtos químicos durante as etapas de produção, processamento e embalagem do leite. Enquanto a contaminação biológica, da ordenha do gado devido à exposição dos úberes ao ambiente, equipamentos, armazenamento, tubulações sujas e outros. A presença de microrganismos nos úberes pode estar associada à colonização ou processos infecciosos denominados de mastite (KANTIANI et al., 2009; ALEGBELEYE et al., 2018; WEBER et al., 2019).

A mastite bovina é considerada a principal patologia relacionada a perdas econômicas nas indústrias de laticínios, no qual promove a redução do rendimento e diminuição na qualidade do leite. São conhecidos diversos fatores de riscos que podem estar associados ao surgimento da mastite bovina, incluindo: patógeno, hospedeiro e fatores ambientais. Todos esses fatores são levados em consideração nos programas de controle da mastite (KLAAS, ZADOKS, 2017; CHENG, HAN, 2020).

3.13 MASTITE BOVINA: CARACTERÍSTICAS GERAIS

Mastite é definida como um processo inflamatório da mama, podendo ser acompanhado de infecção ou não. A mastite pode ser classificada em diferentes categorias, de

acordo com três estágios: aguda, subaguda e granulomatosa; ou de acordo com as manifestações clínicas: clínica ou subclínica. Os sintomas mais comuns de mastite são sensibilidade local, eritema da mama, febre e fadiga (FERNÁNDEZ, 2014). Embora a etiologia exata não seja conhecida, supõe-se que a mastite puerperal ocorra quando um microrganismo agressor obtém acesso ao tecido mamário por meio de uma ruptura na pele do mamilo ou da aréola. Bactérias ou fungos podem, então, se multiplicar dentro do tecido conjuntivo ou ducto da mama (Figura 7) (KLAAS, ZADOKS, 2017).

Infecções bacterianas são apontadas como os principais agentes responsáveis pela mastite bovina. Diversas espécies de microrganismos são relacionadas a essa doença. Além disso, estas infecções podem ser classificadas em dois tipos, de acordo com origem da bactéria: contagiosa ou ambiental. A mastite contagiosa é caracterizada quando a doença é transmitida de bovino para bovino, principalmente durante o momento da ordenha. Entre os patógenos mais prevalentes, destacam-se o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*, e *Corynebacterium* spp. A mastite ambiental é caracterizada quando a doença é causada por um patógeno adquirido do ambiente, e não por meio do contato entre animais contaminados no rebanho. Anteriormente, o termo mastite ambiental era exclusivamente utilizado para formas clínicas da doença causada por espécies de coliformes e *Streptococcus uberis*. Porém, estudos demonstraram a capacidade de desenvolvimento da doença por meio da contaminação ambiental com *S. aureus*, espécies de estafilococos coagulase-negativo e *S. agalactiae* (BARKEMA et al., 2015; KLAAS, ZADOKS, 2017).

Figura 7. Mastite aguda severa bovina causada por bactéria Gram-negativa.



Fonte: RIBEIRO et al. (2008).

Fezes bovina, o ambiente no qual vivem e a pastagem utilizada são as principais fontes de contaminação do rebanho por cepas de *E. coli* e *S. uberis*. A evolução clínica da mastite infecciosa causada por *E. coli* é dependente da resposta imune do hospedeiro, podendo apresentar casos graves que desencadeiam na morte do animal (BRADLEY et al., 2015). A vacinação do rebanho, representa um papel importante nos casos em que a *E. coli* surge como agente causador, podendo estar associado a efetividade da imunidade mediada por anticorpos e fagocitose de neutrófilos na resposta imune. Os estudos de análise genética das cepas de *E. coli* advindas de mastite infecciosa, sugerem uma heterogeneidade entre os microrganismos encontrados pertencentes a esta espécie, que podem estar associados aos casos de infecções transitórias por esse microrganismo, culminando em um perfil genético variável dessa bactéria, impossibilitando a existência de um genótipo consistente de *E. coli* que possa ser relacionada a essa infecção (RICHARDS et al., 2015; KEMPF et al., 2016; KUMARI et al., 2018).

3.14 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS)

As IRAS são apontadas como um dos grandes problemas de saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, associadas ao aumento dos índices de morbimortalidade e do risco à segurança do paciente. São consideradas como o tipo de evento adverso mais prevalente na assistência a saúde humana. Além disso, conduzem ao aumento do tempo de tratamento e hospitalização (WHO, 2017; YIEK et al., 2021).

O conceito de IRAS é descrito como infecções provenientes do processo de assistência a saúde, podendo ser considerado como hospitalar ou extra-hospitalar, como serviços de *home care*, que surgem durante a internação ou após a alta hospitalar e que não estavam presentes, ou o microrganismo estava em período de incubação, durante a admissão do paciente no serviço de assistência a saúde, sendo diagnosticada, em geral, 72h após a internação (HAQUE et al., 2018; YIEK et al., 2021).

Dados do *Center for Disease Control* (CDC, 2016) dos Estados Unidos (EUA), apontam que, por ano, 1,7 milhão dos pacientes que são hospitalizados adquirem IRAS, enquanto estão sendo tratados por outros problemas de saúde. Além disso, aproximadamente 100 mil pacientes morrem por ano, devido essas infecções (HAQUE et al., 2018). No Brasil, são escassos os estudos multicêntricos que contribuem com uma perspectiva próxima da realidade da incidência da IRAS. Fortaleza et al. (2017), a partir de um estudo multicêntrico incluindo 152 hospitais, demonstraram uma prevalência das IRAS em 10,8% dos pacientes

nos serviços de saúde do Brasil.

As IRAS apresentam causas e aspectos clínicos altamente heterogênicos. Considera-se que as mesmas possuem origem multifacetada, relacionadas aos procedimentos e sistemas de assistência à saúde, limitações econômicas e ao comportamento humano, como por exemplo o procedimento de antisepsia das mãos. Embora seja um ato simples, a falta de policiamento entre os prestadores de serviços de saúde é um problema em todo o mundo. Atualmente, as organizações que visam a melhoria da segurança do paciente no ambiente hospitalar estão investindo em campanhas de sensibilização da necessidade de padrões e práticas de higienização das mãos na assistência à saúde (Tabela 3) (HAQUE et al., 2018; SERRA-BURRIEL et al., 2020).

Tabela 3. Métodos de controle e prevenção de IRAS no ambiente hospitalar.

MÉTODO	DESCRIÇÃO
CONTROLE DO PONTO DE ORIGEM	Detecção da origem é efetiva no cenário de surtos;
PRECAUÇÕES PADRÃO	Antisepsia das mãos e o uso de Equipamentos de Proteção Individuais (EPIs);
LIMPEZA E DESINFECÇÃO AMBIENTAL	Contaminação ambiental generalizada é frequentemente relatada em cenário epidêmico e reservatórios ambientais provavelmente desempenham um papel neste panorama;
COORTE DE PACIENTES	Separar pacientes colonizados e infectados em unidades específicas
COORTE DA EQUIPE MÉDICA	Designar equipe médica para cuidar apenas de pacientes colonizados ou infectados
ISOLAMENTO CLÍNICO	Requerido em alguns casos de surtos a fim de interromper a transmissão e permitir a completa desinfecção ambiental
ADMINISTRAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS	Programas para promover o uso criterioso de antimicrobianos a fim de prevenir a emergência de mecanismos de resistência
VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA	Identificação de pacientes colonizados ou infectados para que as intervenções possam ser implementadas

Fonte: Adaptado de VIEIRA, PICOLI (2015).

Além disso, o risco de transmissão cruzada de microrganismos é potencializado pela ineficiência do processo de descontaminação das mãos no contato rotineiro dos profissionais com os pacientes que, muitas vezes, por falta de insumos, reutilizam materiais descartáveis como luvas e aventais durante a prestação do atendimento (SERRA-BURRIEL et al., 2020).

O uso de dispositivos invasivos essenciais à manutenção da hemóstase do paciente, servem como porta de entrada e superfície para a adesão de patógenos. Consequentemente, as

Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) são consideradas como o principal ambiente de assistência à saúde na disseminação das IRAS e com as menores taxas de sobrevivência dos pacientes. Além da utilização de dispositivos médico-hospitalares, o processo de recuperação de cirurgias e os procedimentos de alta complexidade realizados nesse setor, são fatores agravantes que sujeitam os pacientes a essas infecções (HAQUE et al., 2018; COSTA-JÚNIOR et al., 2021).

Nas UTIs, as Infecções Urinárias Associadas a Cateteres (CAUTIs) são apontadas como as principais causas de IRAS em pacientes do sexo feminino, nas quais as taxas de incidência representam cerca de 5% ao dia, entre as pacientes hospitalizadas, sendo a *E. coli* o patógeno mais prevalente associado as CAUTIs. Subsequentemente, o uso intenso de antibióticos no processo de tratamento e profilaxia das infecções, provoca uma alta pressão seletiva nos microrganismos, impulsionando o surgimento de bactérias MDR (HAQUE et al., 2018).

O fenótipo MDR em microrganismos causadores de IRAS, estão associados ao aumento do tempo de estadiamento e altas taxas de morbimortalidade entre pacientes hospitalizados (COSTA-JÚNIOR et al., 2021). Um grupo composto por seis patógenos, são apontados como os principais agentes causadores de IRAS com o fenótipo MDR, conhecidos pelo acrônimo ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (LUPO et al., 2018).

Bacilos Gram-Negativos (BGN), surgem como os patógenos mais prevalentes em IRAS. Estudos sugerem que os BGN são responsáveis por cerca de 80% dos quadros infecciosos em UTIs (BALKHY et al., 2020; WATTAL et al., 2020; ZIÓŁKOWSKI et al., 2021). Similarmente, Yang et al. (2021), a partir da análise de amostras de pacientes ortopédicos acometidos por IRAS, entre os anos de 2012 e 2017, relataram que 70,5% das 1392 cepas isoladas correspondiam a bacilos Gram-negativos, sendo *E. coli* ESBL e *P. aeruginosa* MDR as principais espécies identificadas. Existem fatores de risco para infecções causadas por *E. coli* produtoras de ESBL, dentre eles, o uso indiscriminado de fluoroquinonas, idade avançada e doenças crônicas como a diabetes, são variáveis positivas para infecções causadas por estes microrganismos (YANG et al., 2021).

Além disso, com o surgimento da pandemia causada pelo vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2coronavírus (Sars-CoV-2), relatado pela primeira vez em Wuhan, China, no final de dezembro de 2019, houve um aumento drástico do número de pacientes hospitalizados que precisavam de atendimento hospitalar em todo o globo. Entre os pacientes com a doença do coronavírus (COVID-19), 5-15% necessitam de hospitalização.

Diante do surgimento de sintomas moderados a graves, alguns desses, requerem acompanhamento em UTIs. Assim, a permanência nas UTIs e o uso prolongado de imunossupressor, como forma de tratamento da doença inflamatória causada pelo vírus, como esteroides e inibidores de interleucinas, acarretou no aumento das frequências das IRAS no ambiente hospitalar (AYDEMIR et al., 2022).

3.15 O PAPEL DA COVID-19 NAS IRAS

A COVID-19 disseminou-se rapidamente para outros países e foi declarada em 30 de janeiro de 2020 como uma emergência de saúde pública de interesse internacional. No Brasil, o primeiro caso confirmado de COVID-19 foi em 26 de fevereiro de 2020, na cidade de São Paulo e a primeira morte confirmada em 17 de março de 2020 (CRODA et al., 2020). Antes dos primeiros casos de COVID-19 serem relatados no Brasil, várias medidas foram implementadas, incluindo o ajuste do marco legal para realizar o isolamento e a quarentena. Com a disseminação do vírus no país, e devido a eficácia da capacidade mutagênica do mesmo, ainda em 2020, foram identificadas novas linhagens do SARS-COV-2, (P.1 e P.2), associadas a um alto potencial de transmissão e responsável pelo aumento do número de casos. O aumento significativo das hospitalizações e do tempo de internação em unidades hospitalares, resultou em um colapso da saúde pública em muitos países (CRODA et al., 2020; HUANG et al., 2020).

A doença é caracterizada por se manifestar com um amplo espectro clínico. Os sintomas podem aparecer de acordo com a gravidade da mesma. Nesse caso, pacientes com quadro clínico considerado leve podem apresentar sintomas que incluem febre, tosse seca, dor de garganta, congestão nasal, dores de cabeça e muscular, além de mal-estar. Pacientes com a doença na sua forma moderada podem apresentar sintomas respiratórios como tosse, falta de ar e taquipneia. No entanto, pacientes graves além de apresentar os sintomas descritos, podem evoluir para quadros de pneumonia, Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), sepse ou choque séptico, disfunção de múltiplos órgãos e morte (GUAN et al., 2020; HUANG et al., 2020).

Adicionalmente, os prognósticos desses pacientes agravam ainda mais quando associados a infecções bacterianas secundárias. A utilização de ventilação mecânica, cateteres venosos centrais, procedimentos para manutenção da sobrevivência do paciente, além de hospitalizações prolongadas são fatores que influenciam na predisposição às IRAS (SILVA-JÚNIOR et al., 2017; SILVA et al., 2021). Fatores como a colonização em estado dinâmico

de microrganismos no trato respiratório estão associados à capacidade dos microrganismos oportunistas iniciarem o processo infeccioso. Além da predisposição advinda da idade avançada, presença de comorbidades e variação genética (COSTA-JÚNIOR et al., 2021).

O uso de antibióticos no esquema de tratamento de paciente acometido por COVID-19 é bastante elevado (LANGFORD et al., 2020). Langford et al (2020) realizaram um estudo de meta-análise para determinar a proporção de pacientes que receberam prescrição de antibióticos durante o curso da doença e observaram que 74.6% dos pacientes recebem pelo menos um antimicrobiano como esquema terapêutico. Além disso, determinaram que a variação dessas taxas ocorre de acordo com o país, hospital e características dos pacientes internados. Similarmente, Chen et al., (2020) observaram que 71% dos pacientes hospitalizados positivos para COVID-19, em um hospital da China, receberam antibióticos, apesar da taxa de coinfeção bacteriana no hospital ser de apenas 1%.

As proporções de pacientes com uso de antibióticos do estudo de Langford et al (2020) e Chen et al., (2020) foram significativamente maiores que a de pacientes internados nas enfermarias médicas e cirúrgicas entre os anos de 2016 e 2017, nas quais apresentaram porcentagem de 45% e 55%, respectivamente, de acordo com o estudo de Charani et al. (2019). Neste estudo, os autores avaliaram o uso de antibióticos em 362 pacientes da clínica médica e 297 da clínica cirúrgica.

Embora o tratamento da COVID-19 com antimicrobianos seja ineficaz, existem várias razões pelas quais a prescrição de antimicrobianos é necessária. Os pacientes podem apresentar sintomas semelhantes aos de pneumonias bacterianas, ocorrendo suspeita de coinfeções ou confirmação, além dos protocolos internos nas unidades hospitalares que podem sugerir o uso de profilaxia antimicrobiana (LANGFORD et al., 2020). Entretanto, infecções secundárias em pacientes com COVID-19 devido à alta demanda das internações hospitalares durante a pandemia, associado ao uso de antimicrobianos podem contribuir para o aumento do risco da transmissão de microrganismos MDR (KARIYAWASAM et al., 2022).

A seleção e o desenvolvimento de microrganismos altamente resistentes devido ao uso excessivo de antimicrobianos podem determinar o prognóstico clínico de pacientes graves hospitalizados com COVID-19. Nesse contexto, microrganismos extremamente resistentes a medicamentos e pan-resistentes causam coinfeções graves em pacientes com COVID-19 facilitando a disseminação através dos tecidos e desencadeando quadros mais graves de tratar (GHOSH; BORNMAN; ZAFER, 2021).

A coinfeção bacteriana e o risco que ela representa para pacientes com COVID-19 permanece sendo uma área pouco estudada. Microrganismos como a *E. coli*, que apresentam

alta prevalência em infecções comunitárias e hospitalares são importantes ferramentas de estudos para avaliação da RAM em pacientes com COVID-19 (HUANG et al., 2020; FUGA et al., 2022). Garcia-vidal (2021) descreveram uma prevalência de 33.5% de infecções urinárias causadas por *E. coli* em pacientes internados devido COVID-19 em um hospital de Barcelona, Espanha.

3.16 SAÚDE ÚNICA (*One Health*)

O surgimento do termo *One Health* ocorreu entre os anos de 2003-2004, devido à incidência da Doença Respiratória Aguda Grave (SARS) no início do ano de 2003, e ao subsequente aumento da disseminação de cepas da gripe aviária (H₅N₁). Com o intuito de controlar a disseminação dessas infecções altamente patogênicas, teve início a criação de uma série de objetivos estratégicos conhecidos como *Manhattan principles*, nos quais foram derivados de uma reunião que ocorreu no ano de 2004, organizada pela *Wildlife Conservation Society*. Na ocasião, houve o reconhecimento por parte da comunidade científica da ligação entre a saúde humana e animal, além das ameaças que a disseminação de patógenos representava para o abastecimento de alimentos, saúde pública e economia. Diante disso, houve a compreensão da importância da colaboração das áreas interdisciplinares no controle das doenças emergentes, além da inclusão do estudo da saúde da vida selvagem como um componente essencial no controle, mitigação e prevenção de doenças (MACKENZIE, JEGGO, 2019; MACHALABA et al., 2021).

Em contrapartida, o conceito de *One health* não deve ser considerado como recente, pelo fato, dessa abordagem ter sido anteriormente citada, porém, com a utilização de outros termos, como: *One Medicine* e *One World*. *One Medicine* é o título de um livro publicado no ano de 1964. Neste, os autores enfatizavam as semelhanças que existiam entre a saúde humana e animal e a necessidade da colaboração de ambas as áreas na prevenção e controle das infecções zoonóticas (TAYLOR et al., 2001; MACHALABA et al., 2021).

Um dos primeiros estudos que avaliaram o impacto da saúde animal como um fator de risco para saúde humana foi realizado por Taylor et al. (2001). Nesse estudo, os autores analisaram, por meio de revisão da literatura, a diversidade de agentes causadores de infecções em humanos e animais, reportando a identificação de 1.415 espécies de organismos infecciosos conhecidos por serem patogênicos para a vida humana, incluindo 217 (15,3%) vírus e *prions*, 538 (38%) bactérias e *Rickettsias*, 307 (21,7%) fungos, 66 (4,7%) protozoários e 287 (22,3%) helmintos. Dentre essas espécies de organismos, 868 (61%) foram

consideradas como zoonóticas, quando analisada a incidência desses como agentes causadores de infecções em animais.

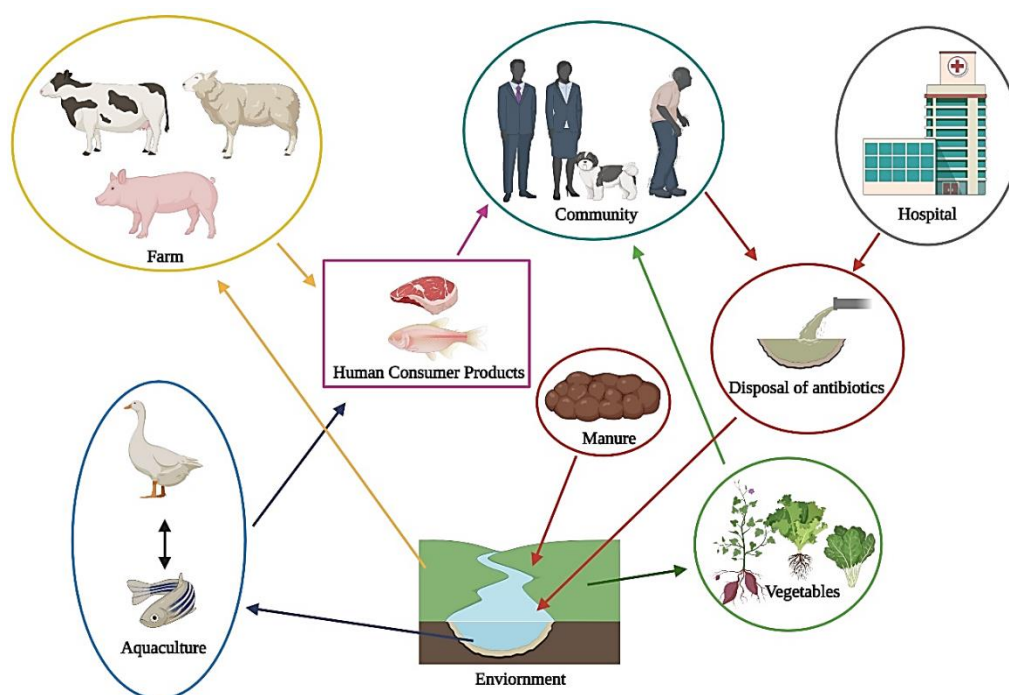
Embora, nos últimos anos, tenham ocorrido grandes avanços no desenvolvimento de vacinas e medicamentos direcionados ao tratamento e controle de surtos ocasionados por doenças emergentes, a utilização de medidas reativas de respostas profiláticas ou equivocadas na prevenção de surtos ou no tratamento está associada a um custo significativo a longo prazo. A exemplo, pode-se mencionar a disseminação da Resistência Antimicrobiana (RAM), que possui como um dos fatores de potencialização o uso irracional de antimicrobianos na saúde humana e animal (Figura 8) (MACKENZIE, JEGGO, 2019; MACHALABA et al., 2021).

A adoção de abordagens *One health* em âmbito nacional e internacional é apontada como uma das principais ferramentas na redução dos índices de morbimortalidade e hospitalização dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Além, de estar relacionada à diminuição dos custos à saúde pública e terapia medicamentosa direcionada (COSTA-JÚNIOR et al., 2022; ROCHA et al., 2022).

Nos estudos de RAM, essa abordagem é aplicada principalmente para o rastreio da disseminação de clones bacterianos portadores de genes de resistência aos antibióticos. Bactérias resistentes a antibióticos, oriundas da clínica, seja para uso humano ou veterinário, podem se espalhar facilmente para o meio ambiente. Além disso, em Gram-negativas a facilidade de aquisição e dispersão de genes de resistência é ocasionada pelo processo de conjugação. Formas bioativas inalteradas de medicamentos podem ser excretadas de pacientes humanos e entrar no meio ambiente devido à ineficiência do tratamento de águas residuais. Além dos excrementos de animais usados como esterco na agricultura, que podem carregar diversas espécies diferentes de cepas resistentes (KIEFFER et al., 2018; ROCHA et al., 2020).

Além disso, o consumo de alimentos de origem animal é uma outra via de possível contaminação de humanos por microrganismos resistentes. Entre eles, o leite bovino pode carrear cepas portadoras de genes de resistência. A mastite infecciosa é uma das principais doenças em bovinos que pode estar associada às cepas bacterianas resistentes e contaminação do leite, entre elas, cepas de *E. coli* (CHENG, HAN, 2020).

Figura 8. Potencial de transmissão de cepas resistentes a antibióticos no ambiente.



Fonte: COSTA-JÚNIOR et al. (2022)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa tese estão apresentados na forma de 4 artigos. Um artigo publicado, um artigo submetido e dois artigos em preparação para submissão e publicação.

4.1 ARTIGO 1: Dissemination and prevalence of polymyxin-resistant bacteria of clinical and environmental origin

O artigo “**Dissemination and prevalence of polymyxin-resistant bacteria of clinical and environmental origin**” foi publicado no periódico “RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT, v. 11, n. 13, p. e94111334996, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i13.34996. Link de acesso: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/34996>.

Dissemination and prevalence of polymyxin-resistant bacteria of clinical and environmental origin

Sérgio Dias da **COSTA JÚNIOR**

Keizo Asami Imunopatologia Laboratório , Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-2501-3284>

Luís André de Almeida **CAMPOS**

Keizo Asami Imunopatologia Laboratório , Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-9849-922X>

Iago Dillion Lima **CAVALCANTI**

Keizo Laboratório de Imunopatologia Asami , Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil

<https://orcid.org/0000-0001-6625-8395>

Jainaldo Alves da **COSTA**

Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-1308-9329>

Gustavo Ramos Salles **FERREIRA**

Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil

<https://orcid.org/0000-0001-8170-8745>

Sivoneide Maria da **SILVA**

Centro de Inovação Terapêutica - Suely Galdino , Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-6507-2609>

Maria Betânia Melo de **OLIVEIRA**

Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil

<https://orcid.org/0000-0001-5188-3243>

Resumo

As polimixinas foram descobertas na década de 1940 e eram usadas para tratar infecções = por bactérias Gram-negativas. Esses fármacos atuam destruindo a membrana através da desestabilização de fosfolípidios. Devido a efeitos adversos, como nefrotoxicidade e neurotoxicidade, teve o seu uso limitado. No entanto, com a evolução da resistência antimicrobiana, o uso de polimixinas foi renovado e, com os medicamentos, foram observadas cepas resistentes a esses medicamentos. Atualmente, bactérias resistentes a estes antimicrobianos estão em ambientes hospitalares e não antropizados. Essa ocorrência constitui um problema global de saúde humana e ambiental que preocupa a população, profissionais de saúde e pesquisa. Assim, esta revisão foi realizada com o objetivo de descrever os mecanismos e a ocorrência de resistência bacteriana às polimixinas, e demonstra uma relação entre cepas multirresistentes de origem clínica e ambiental.

Palavras-chaves: *Bacillus polymyxa*; colistina; mecanismos de resistência; saúde pública.

4.2 ARTIGO 2: Bacilos Gram-negativos portadores do gene *mcr* no Brasil: um patógeno em ascensão

O manuscrito intitulado “**Bacilos Gram-negativos portadores do gene *mcr* no Brasil: um patógeno em ascensão**” encontra-se aceito para publicação na revista *Brazillian Journal of Microbiology*.

Bacilos Gram-negativos portadores do gene *mcr* no Brasil: um patógeno em ascensão

Autores: Sérgio Dias Costa-Júnior¹; Ylanna Larissa Alves Ferreira²; Maria Anndressa Alves Agreles²; Álisson Emannuel Franco Alves¹; Maria Betânia de Melo Oliveira³; Isabella Macário Ferro Cavalcanti^{2,4*}

Instituições: ¹Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58.051-900, João Pessoa, Brasil; ²Instituto Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco (iLIKA /UFPE), 50.670-901, Recife, Brasil; ³Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Moraes Rego s/n, Recife, PE, Brasil; ⁴Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (CAV/UFPE), 55.608-680, Vitória de Santo Antão, Brasil.

Resumo

A incidência de infecções causadas por patógenos Gram-negativos resistentes tornou-se um fator crítico em saúde pública devido à limitação das opções terapêuticas para o controle de infecções causadas, principalmente, por *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. Assim, diante do aumento de patógenos resistentes e da redução das opções terapêuticas, as polimixinas foram reintroduzidas na clínica. Como última opção de tratamento, as polimixinas foram consideradas a chave terapêutica, pois eram uma das poucas classes de antimicrobianos que apresentavam atividade contra bacilos Gram-negativos multirresistentes. No entanto, ao longo dos anos, o uso frequente desse antimicrobiano levou a relatos de casos de resistência. Em 2015, o *mobile-colistin-resistance* (*mcr*), um gene de resistência à colistina, foi descrito na China. Devido à sua localização nos plasmídeos transportadores, este gene é caracterizado pela rápida disseminação através da conjugação. Assim, foi classificado como uma ameaça crescente à saúde pública em todo o mundo. Em conclusão, com base em vários relatos que mostram o surgimento de *mcr* em diferentes contextos regionais e climáticos e espécies de isolados, este trabalho tem como objetivo revisar a literatura sobre a incidência do gene *mcr* no Brasil em diferentes regiões, tipos de amostras identificadas, espécies de isolados e tipo de plasmídeo transportador.

Palavras-chave: Resistência Antimicrobiana; Polimixinas; gene de resistência à colistina; saúde pública.

Introdução

Recentemente, a Resistência Antimicrobiana (RAM) tornou-se um fator crítico na saúde pública devido à redução das opções terapêuticas associadas ao aumento das taxas de morbidade e mortalidade [1,2]. Primeiro, com o desenvolvimento e comercialização de antimicrobianos, juntamente com o aumento das taxas de prevalência de resistência bacteriana, a comunidade científica tem se concentrado em patógenos Gram-positivos [4,5]. Assim, a mudança no padrão de suscetibilidade dos patógenos e a multirresistência (MDR) apresentada pelos bacilos Gram-negativos tornou-se uma ameaça para a comunidade médica e científica em todo o mundo [5]. De fato, entre 2000 e 2010, aproximadamente 70 bilhões de doses de antibióticos foram administradas globalmente e 50% das doses são usadas incorretamente ou de forma desnecessária, facilitando assim o desenvolvimento da RAM [1,6].

A RAM é dividida em dois tipos: i) resistência inata e ii) resistência adquirida. A resistência intrínseca ou inata é caracterizada pelas particularidades de cada microrganismo e depende de suas características biológicas. Além disso, a resistência adquirida pode resultar da aquisição de genes de resistência, mutação do DNA cromossômico ou de ambos os mecanismos [7]. Devido ao desenvolvimento de patógenos resistentes ao longo dos anos, novas classes de medicamentos foram identificadas. Nos últimos 20 anos, duas novas classes

de antibióticos, lipopeptídeos e oxazolidinonas, foram classificadas e aprovadas para uso. No entanto, a rápida capacidade das bactérias de adquirir resistência a essas novas classes as tornaram ineficazes contra algumas populações bacterianas [8].

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a falta de opções de tratamento para Bacilos Gram-negativos multirresistentes (BGN-MDR), incluindo como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp., resulta em infecções graves que podem levar a problemas de saúde pública [9]. O uso irracional de carbapenêmicos foi devido ao surgimento de cefalosporinases, que por sua vez resultou em resistência aos carbapenêmicos [3, 10]. Portanto, com o aumento de patógenos resistentes aos carbapenêmicos, as polimixinas foram reintroduzidas na clínica como uma das últimas opções para o tratamento da BGN-MDR [5, 10, 11].

As polimixinas foram descobertas em 1947, mas na década de 1970, após sua incorporação na prática clínica, descobriu-se que apresentavam alto potencial nefrotóxico. Após o surgimento de casos frequentes de pacientes com disfunção renal e a necessidade de medicamentos mais seguros, o uso de polimixinas ficou limitado apenas ao tratamento de infecções tópicas [13]. No entanto, em uma era de bactérias MDR, antimicrobianos antigos ressurgiram como opções de tratamento, sendo, em alguns casos, os únicos com atividade contra BGN-MDR [13, 14].

Ho et al. em 2010 [15] descreveram as polimixinas como uma terapêutica chave para infecções causadas por patógenos resistentes a carbapenêmicos. No entanto, com o aumento do uso dessas drogas, observou-se um aumento nos casos de resistência a esses lipopeptídeos [16]. Em 2015, na China, foi identificado um gene transferível de resistência à colistina mediado por plasmídeo, *mcr-1*, cujo produto gênico, a proteína MCR-1, modifica o componente lipídico A do LPS, inibindo a ligação de polimixinas ao alvo [17, 18].

Foi demonstrado que a produção de MCR-1 em patógenos como *E. coli* leva a um aumento nas CIMs de polimixinas em até oito vezes; portanto, mesmo sem mecanismos de resistência adicionais, a produção desta enzima é suficiente para desenvolver resistência às polimixinas [16]. Além disso, a localização do gene *mcr* nos plasmídeos o torna favorável à rápida propagação por conjugação, especialmente em isolados de *E. coli* [17, 19].

Relatos iniciais da presença de *mcr-1* no Brasil foram baseados em 16 amostras de *E. coli* isoladas de aves e suínos. Subsequentemente, o primeiro caso de isolados clínicos e amostras ambientais carregando *mcr-1* foi relatado [20, 21]. Atualmente, existem vários relatos de isolados que produzem MCR-1 relacionados a infecções hospitalares em todo o país [22]. Assim, o presente estudo teve como objetivo compreender, por meio de uma revisão

narrativa da literatura, as variantes presentes nos relatos da incidência de BGN portadores do gene *mcr* no Brasil.

Características dos Bacilos Gram-Negativos

Através da ação dos fatores de virulência, as bactérias utilizam informações genéticas para realizar sua infecção e resistir às defesas do hospedeiro [23]. Esses fatores são divididos de acordo com seu mecanismo e/ou função, por exemplo: (a) proteínas de membrana, que desempenham papel fundamental na adesão, colonização e invasão do hospedeiro, além de promover a comunicação intercelular por meio da liberação de moléculas *Quorum Sensing*; (b) proteínas secretoras de toxinas capazes de modificar o ambiente da célula hospedeira e são responsáveis por algumas interações célula hospedeira-bactéria; (c) componentes da membrana externa, como lipopolissacarídeo (LPS) que podem proteger contra a lise mediada pelo sistema complemento; e (d) capacidade de formar biofilmes, que são agregados bacterianos contidos em matrizes extracelulares de polissacarídeos, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. Essa matriz confere certa resistência às bactérias, restringindo a ação dos antibióticos, reduzindo a taxa de crescimento e até neutralizando o sistema imunológico. Portanto, este último fator de resistência associado a mecanismos de resistência bacteriana destacados contribui sinergicamente para a ampla disseminação de cepas BGN-MDR [24, 25].

Patógenos Gram-negativos possuem mutações genéticas e adquirem elementos genéticos móveis que conferem mecanismos de resistência. Devido a isso, estão entre os patógenos mais comuns em infecções comunitárias e hospitalares, pois apresentam alta taxa de transmissão [24-26]. Além disso, os genes de resistência tornaram-se um sério problema de saúde pública em todo o mundo, especialmente entre os antimicrobianos β -lactâmicos [15, 22].

Conforme destacado por Mota et al. [27], enterobactérias e bacilos Gram-negativos não fermentadores (GNNFB) são os patógenos mais comuns associados a infecções nosocomiais. Considerando os microrganismos isolados, *K. pneumoniae*, seguido por *E. coli*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, apresentaram a maior prevalência. Além disso, foi analisado o perfil de resistência bacteriana aos antimicrobianos e uma resistência significativa às quinolonas (88,8%), cefalosporinas de segunda geração (57,9%), penicilinas (56,2%), cefalosporinas de terceira geração (51,9%) e carbapenêmicos (46,1%) foi observado. Em relação ao BGNNF, percebeu-se que para *A. baumannii* a resistência poderia estar entre 80% e 100% para cefepima, ciprofloxacina e meropenem, de 50% a 70% para imipenem, piperacilina/tazobactam, cefoxitina, ceftazidima e gentamicina. Isolados de *P. aeruginosa*

apresentaram menor taxa de resistência em geral quando comparados a outras espécies bacterianas, variando de 30% a 40% para cefoxitina, cefuroxima, imipenem e meropenem [27].

Mecanismos de Resistência em Bacilos Gram-negativos

A maioria dos antimicrobianos são produzidos naturalmente, e as bactérias co-residentes desenvolvem um mecanismo de resistência natural conhecido como resistência intrínseca [28]. Depois de se estabelecer no genoma de um gênero ou espécie de microrganismo, a resistência inata propagar-se através das gerações seguintes. Existem várias causas para esta característica, tais como a falta de afinidade do fármaco com o alvo, inaccessibilidade ao interior da célula bacteriana, ou extrusão do fármaco por exportadores ativos, bombas de efluxo, e ainda a produção inata de enzimas que inativam o fármaco [29,30].

A resistência adquirida é definida como um processo em que a bactéria que originalmente apresentava susceptibilidade ao fármaco se torna resistente. O desenvolvimento desta resistência é o resultado de mutações genéticas transferidas da célula mãe para a célula filha ou através de mecanismos de troca de genes [28]. Clinicamente a resistência adquirida é mais significativa devido à elevada propagação de genes de resistência [29]. Esta transferência pode ser realizada por plasmídeos, que podem transportar genes de resistência a múltiplas classes de antibióticos e integrar-se no genoma bacteriano [31].

O mecanismo de transferência de material genético inclui conjugação, transdução, e transformação [32]. O processo de transferência de genes por conjugação ocorre através do contato entre a superfície celular do doador e a transferência do plasmídeo portador do gene de resistência para o receptor, o que, por sua vez, tem sido amplamente reportado nos patógenos Gram-negativos [33].

A produção de enzimas modificadoras de antimicrobianos é outro mecanismo de resistência que pode ser mediado por plasmídeos. A resistência de *P. aeruginosa* à fosfomicina é um dos exemplos deste tipo de resistência relatada na clínica [33]. Outro meio reportado de aquisição do gene de resistência são as mutações cromossômicas que ocorrem na reparação incorreta do DNA ou durante a replicação cromossômica. Além disso, estes genes também expressam resistência através de sistemas de efluxo, tomando como exemplo a resistência às fluorquinolonas presentes em vários isolados Gram-negativos [32,33,48].

Como resultado de múltiplos mecanismos de resistência que coexistem dentro de um agente patogênico, um fenótipo MDR tornou-se comum entre os isolados associados a

infecções hospitalares [22]. Em 2011, foram criadas terminologias para padronizar e descrever os perfis de microrganismos amplamente resistentes, tais como, MDR (Multidrug-Resistente) - resistente a 3 ou mais classes de antimicrobianos; XDR (extensivamente resistente aos medicamentos) - microrganismos que permanecem susceptíveis a pelo menos um ou dois antibióticos pertencentes a duas classes diferentes; PDR (Pandrug-Resistente) - resistência comprovada em todas as categorias de antimicrobianos testados. Desta forma, o aumento da taxa de detecção de agentes patogénicos com resistência generalizada MDR, XDR, e PDR é atribuído a uma combinação de características microbianas, uso descontrolado de antibióticos, e disseminação de genes de resistência [30].

A alarmante falta de antimicrobianos eficazes para combater agentes patogénicos com um amplo espectro de resistência nos últimos anos levou à reintrodução das polimixinas B e E, dois antibióticos dos anos 60 que tinham uma atividade *in vitro* promissora contra agentes patogénicos resistentes, mas a sua utilização foi limitada devido à sua elevada incidência de nefrotoxicidade e neurotoxicidade [34,35]. A utilização intensa de polimixinas para a ausência de antibióticos igualmente eficazes, levou consequentemente à identificação de algumas estirpes resistentes a estes antibióticos pouco tempo após o seu regresso, embora esta resistência fosse cromossômica, e por isso não havia risco de rápida distribuição e disseminação [36]. Contudo, todo o cenário de utilização de polimixinas está incisivamente ameaçado com o primeiro relatório de resistência plasmidial, atribuído ao novo gene *mcr-1* [37].

Polimixinas e o Gene de Resistência Plasmidial

É essencial que os antibióticos penetrem nas barreiras anfífilas bacterianas, permitindo que o componente ativo entre na célula. Os antibióticos cíclicos têm esta capacidade de interagir com as membranas bacterianas. Neste contexto, os compostos constituintes desta classe têm sido utilizados na linha da frente contra infecções causadas por isolados de Gram-negativos MDR [38,39].

A polimixina foi obtida do microrganismo *Paenibacillus polymyxa* [40]. A sua estrutura química é composta por um núcleo decapeptídeo que contém um ciclo intramolecular de heptapeptídeos ligados por ligações do tipo entre o grupo amino da cadeia lateral do resíduo de ácido diaminobutírico (Dab) na posição 4 e o grupo carboxil no terminal do resíduo C-treonina. Outra característica estrutural importante da cadeia da polimixina é a presença de cinco resíduos não proteogénicos Dab, que são carregados positivamente a pH fisiológico, resíduos hidrofóbicos, e um grupo N-terminal de acilo. Esta classe de

antimicrobianos é formada por um grupo de cinco compostos (A, B, C, D e E), que diferem em termos de sequências de aminoácidos e cadeias laterais de ácidos gordos [41]. A estrutura química da polimixina B e E (colistina) diferem pela presença de um aminoácido D-Leucina na molécula de colistina, e D-Fenilalanina na molécula de polimixina B [42].

As polimixinas atuam ligando-se ao lipopolissacarídeo (LPS) e às moléculas fosfolípidas encontradas na membrana externa das bactérias Gram-negativas. Este processo resulta em uma alteração da parede celular do microrganismo, levando ao extravasamento do conteúdo intracelular e, conseqüentemente, à morte da bactéria [43]. Devido à interação eletrostática entre moléculas antimicrobianas com o grupo fosfato do lipídio A da membrana bacteriana, as polimixinas têm uma maior afinidade com o LPS bacteriano quando comparadas com os cátions de magnésio e cálcio, que por sua vez estabilizam o LPS. Esta interação provoca uma mudança nos íons de cálcio e magnésio, permitindo assim a ligação do princípio ativo à membrana do microrganismo, resultando no desarranjo na membrana e, mais tarde, no aumento da absorção do antibiótico, o que leva a um desequilíbrio osmótico, causando a morte celular [44].

Entre os outros mecanismos de ação das polimixinas estão a inibição de enzimas essenciais à respiração celular em bactérias, tais como a NADH-quinona oxidoreductase tipo II [45]. Contudo, tem sido relatado que a susceptibilidade à polimixina diminuiu, bem como um aumento das infecções causadas por agentes patogênicos Gram-negativos resistentes à polimixina. A resistência à polimixina foi principalmente observada em isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli*. Assim, a eficácia clínica desta classe de antimicrobianos tornou-se limitada quando utilizada como monoterapia [22, 46].

O mecanismo pelo qual os agentes patogênicos Gram-negativos se tornam resistentes às polimixinas envolve uma modificação química da membrana externa bacteriana [47]. Estas modificações são mediadas por dois componentes, PhoP/Q e PmrA/B, que regulam a resistência alterando a carga catiônica e o padrão iônico da membrana externa, acarretando uma diminuição da carga aniônica e, conseqüentemente, impedindo a interação eletrostática da célula bacteriana com as moléculas da droga [48].

A regulação dos genes resulta na modificação do LPS que conduz à resistência. A regulação dos genes é mediada por Sistemas de Enzimas de Dois Componentes (TCS) que normalmente regulam a resistência e os fatores de virulência [49]. A ação dos sistemas de bomba de efluxo, alterações nas concentrações proteicas da membrana externa (porinas) e espessamento da cápsula de polissacarídeo são também extremamente importantes para o desenvolvimento da resistência patogênica às polimixinas entre os constituintes da ordem

Enterobacterales [38].

Além da resistência mediada por mutações envolvendo TCSs, o mecanismo codificado por um gene de localização de plasmidial, *mcr-1*, descrito na China em 2015, tornou-se a principal causa da resistência à polimixina. Existem dois tipos de alterações químicas na membrana externa dos bacilos Gram-negativos que levam à resistência às polimixinas, uma das principais é a adição de 4-amino-4-deoxi-L-arabinose (L-Ara4N) no componente lipídico A do LPS, reduzindo a atividade antimicrobiana da membrana. Outra forma é a adição de fosfoetanolamina (PEA) ao grupo 1-(4')-fosfato do lipídio A, promovendo resistência intrínseca às polimixinas [50].

MCR-1 é descrita como a lipase A-40-PEA-transferase. Esta família de fosfatases alcalinas catalisa a ligação da fosfatidiletanolamina (PEA) ao LPS lipídio A e, consequentemente, leva à resistência à colistina [51]. Assim, a resistência transferível à polimixina está relacionada com a adição de PEA ao LPS lipídico A pela MCR-1 [52]. Além disso, a localização do gene *mcr* nos plasmídeos favorece a rápida propagação por conjugação, especialmente nos isolados de *E. coli* (Figura I). A presença deste gene em uma variedade de plasmídeos destaca a sua capacidade de propagação (Tabela I) [17, 19, 53].

Jeannot et al. [68] destacaram a transferência interespecie de genes móveis como um fator responsável pela propagação progressiva de genes de resistência. Além disso, foi observado o mecanismo intrínseco e taxas de resistência à polimixina em *Enterobacteriaceae* e isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* em 2017. No seu estudo, Jeannot et al. [53] confirmaram que o *mcr* está localizado no plasmídeo transferível, o que, por sua vez, representa um elevado fator de propagação por conjugação.

De acordo com os estudos presentes na plataforma NCBI, foram descritas até o momento as variantes *mcr-1* a *mcr-10*, em várias espécies de microrganismos. O gene *mcr-1* tem 13 sub-variantes, a maioria das quais foram relatadas em *E. coli* [54]. As variantes descritas podem ser encontradas em diferentes classes de plasmídeos, caracterizando uma diversidade de reservatórios de genes. IncI2, IncHI2 e IncX4 são descritos como os principais grupos de plasmídeos responsáveis por transportar genes de resistência. Estudos descrevem a propagação da resistência à colistina relacionada com genes de várias variantes, locais, tipos de amostras analisadas, espécies de isolados, e tipo de plasmídeos portadores no Brasil [30,34].

Incidência do *mcr* nas Amostras Clínicas Humanas

No Brasil, as primeiras bactérias Gram-negativas com resistência à polimixina foram

identificadas em isolados de *E. coli* [63,64]. Os casos de resistência à colistina em isolados clínicos em humanos começaram a ser relatados em 2016, como pode ser visto na Tabela II. Transportado pelo plasmídeo IncX4, o *mcr-1* foi detectado em estirpes de *E. coli* (ST-101) recuperadas de um paciente diabético com infecção no pé [20]. O caso ocorreu na região Nordeste do Brasil e foi realizada uma análise completa do genoma [20].

Em diferentes estudos, o IncX4 foi identificado como o principal portador do gene de resistência à colistina em *Enterobacteriaceae*; estes plasmídeos foram encontrados em uma variedade de espécies, pertencentes a diferentes Tipos Sequenciais (STs) e de amostras, tais como alimentos, animais, e isolados clínicos [20]. Como resultado, a presença deste carreador em diferentes continentes indica que é um dos fatores importantes da propagação do gene *mcr-1*. Similarmente, Zamparetti et al. [21] relataram a presença do IncX4 em dois isolados de *E. coli* (ST-206 e ST-354) carreando o gene *mcr-1.1*.

Girardello et al. [65] isolaram 490 cepas Gram-negativas resistentes a colistina de infecções humanas de ambiente hospitalar, das quais oito foram *E. coli mcr-1.1* positiva. Os genomas destas bactérias foram sequenciados, mostrando que a *mcr-1.1* estava localizada no *contig* de um plasmídeo IncX4 em sete dos oito isolados. No último, o *mcr-1.1* foi localizado no *contig* de um plasmídeo IncHI2A.

Curiosamente, os isolados positivos para *mcr-1* obtidos de pacientes de um hospital ambulatorial em Santa Catarina (RS), que não foram diretamente expostos à polimixina, mostraram uma afinidade de aproximadamente 99,9% com os plasmídeos IncX4 relatados na China e no Brasil pela primeira vez. O plasmídeo IncX4 foi encontrado como um dos principais vetores de propagação de *mcr* em ambas as análises [21, 66]. Além disso, Vasconcelos et al. [66] detectaram a presença de outros genes para MDR, tais como o *bla*_{CTX-M-2}.

A coexistência de genes de resistência tornou-se uma grande preocupação devido à falta de opções terapêuticas [67]. Vários estudos relataram a ocorrência de mais de um gene de resistência em isolados de enterobactérias, especialmente em produtoras de Betalactamases de Espectro Extendido (ESBL) [67]. Conceição-Neto et al. [67] e Dalmolin et al. [64] descreveram a coexistência de genes de resistência à colistina e carbapenéns. Dalmolin et al. [64] relataram um caso de *K. pneumoniae* carreando *mcr-1* e *bla*_{KPC-2}. A análise foi realizada através do rastreio de 3.468 isolados recuperados em vários hospitais da região sul do Brasil, entre 2013 e 2016. Outro caso de *K. pneumoniae* portador dos genes *mcr-1* e *bla*_{KPC} foi descrito em um paciente diagnosticado com trombose de um hospital em Vitória (ES) [68]. Em outro estudo, foi relatado um único isolado contendo os dois genes de resistência. Uma

análise das sequenciais revelou que os plasmídeos portadores de *mcr-1* e *bla*_{KPC} pertenciam aos grupos IncX4 e IncFIB, respectivamente [64].

Nitz et al. [69] avaliaram o perfil molecular dos genes de virulência e resistência em 99 isolados de *P. aeruginosa* coletados de várias amostras clínicas, uma das cepas foi portadora do *mcr-1*. Com exceção dos carbapenêns, imipenem e meropenem, aos quais era sensível, este isolado mostrou resistência a pelo menos um antibiótico de cada classe testada, diferente dos apresentados em cepas isoladas de carne animal [69].

Rocha et al. [70], observaram a presença de variantes do *mcr-1* em isolados de *Enterobacteriaceae* recuperados de isolados clínicos em um Hospital de Recife, Pernambuco. Posteriormente, vários estudos indicaram a presença de diferentes variantes no Brasil ao longo dos anos, neste contexto. Kieffer et al. [71], Martins-Sorenson et al. [72] e Dos Santos et al. [74] relataram o aparecimento dos alelos *mcr-3.12*, *mcr-4.3* e *mcr-3* e *mcr-7*, respectivamente, transportados pelo plasmídeo IncY, em diferentes tipos de amostras e diferentes isolados. Estes estudos mostraram uma diferença nos plasmídeos portadores dos genes de resistência. Kieffer et al. [71] descreveram um plasmídeo IncA/C2, e Martins-Sorenson [92] descreveram um plasmídeo previamente desconhecido, pAb-MCR4,3, que transportava *mcr-4,3* em isolados *A. baumannii*. O alelo *mcr-9,1* em isolados de *Salmonella typhimurium* foi identificado pela primeira vez a partir de um isolado clínico em 2019, contudo, devido à rápida disseminação, este alelo foi reportado globalmente entre as *Enterobacteriaceae* [75].

Além disso, com o aparecimento da pandemia da COVID-19, causada pelo vírus Sars-CoV-2, houve um aumento no número e tempo de interações no ambiente hospitalar, causando um aumento na ocorrência de infecções secundárias e a propagação de microrganismos no ambiente hospitalar. Estes fatores podem favorecer ainda mais a propagação de cepas portadoras do *mcr* em isolados clínicos humanos [76].

Incidência do *mcr* em Animais e Carne de Animais

A utilização extensiva de polimixinas em animais de produção foi reconhecida como uma das principais causas do aparecimento e rápida propagação do gene de resistência. Neste contexto, os primeiros relatórios destes isolados foram obtidos a partir do comércio em carejo de carne de porco e de frango [20,66]. Vasconcelos et al. [66] identificaram o IncX4 como portador do gene *mcr-1* em cepas de *E. coli* (ST-359) obtidas a partir das carcaças de frango de um mercado público na região Nordeste do Brasil.

Gado brasileiro sem contato prévio com a polimixina mostrou vários genes de resistência, de acordo com Palmeira et al. [77]. No estudo, a presença de *mcr-1* e *bla*_{CTX-M-2}

foi observada em um isolado de *E. coli* (ST-443). Os genes de resistência à colistina e de ESBL estavam em plasmídeos separados, IncX4 e IncF, respectivamente. Fuentes-Castillo et al. [78], por sua vez, relataram a coexistência de genes de resistência em isolados de *Enterobacter kobei* (E11R). Os isolados foram recuperados de uma cultura do exsudado respiratório de um golfinho franciscano, uma espécie ameaçada de extinção. As análises relataram a presença de *mcr-9.1* e *bla_{CTX-M-15}*, além dos genes de resistência aos aminoglicosídeos, tetraciclina, fluorquinolona, fosfomicina e sulfonamida.

Em 2020, a resistência à colistina mediada pelo *mcr-9* foi descrita por Leite et al. [75] em isolados de *S. typhimurium* (ST-19) de suínos. A resistência foi determinada pela CIM, e a partir do sequenciamento do genoma foi relatada a presença dos plasmídeos IncHI2 e IncHI2A. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* portador do *mcr-1* foi descrito em 2018, em amostras retiradas de reservatórios de carne de porco no sul do Brasil [79]. Similarmente, estudo realizado por Rau et al. [79], observou uma cepa de *S. enterica* portadora do gene de resistência à colistina em alimentos produzidos no Brasil; 90% dos isolados detectados pertenciam ao serovar *Typhimurium* e abrigavam o gene *mcr-1* no plasmídeo IncX4 (Tabela III).

Estudo realizado por Moreno et al. [81] detectaram outro tipo de *Salmonella* portadora do gene de resistência à colistina. No estudo, foram selecionadas amostras de carne de frango para testes de presença do gene *mcr*. Foram identificados dois isolados portadores do gene e a análise do genoma determinou a presença do serovar *Schwarzengrund* (ST-96) no plasmídeo IncX4. O serovar *Schwarzengrund* já havia sido isolado de aves e em carne de aves; no entanto, poucos estudos indicaram a presença de resistência bacteriana. Saidenberg et al. [82] relataram a presença de *E. coli* MDR portadora do *mcr-1* (ST131-H22) em aves de capoeira domésticas. Os isolados mostraram as variantes *mcr-5.1* e *mcr-9*, sugerindo o papel da avicultura como um dos principais reservatórios de resistência às colistinas em enterobactérias patogênicas. Correspondentemente, Barbieri et al. [84] analisaram a presença do *mcr* em 107 isolados de *E. coli* obtidos de aves de capoeira de produção. O gene foi encontrado em 62 (57.9%) isolados, enquanto que o gene *mcr-5* em três (2,8%) isolados; todos estes isolados eram fenotipicamente resistentes à colistina (MIC > 8ug/ml). IncI2, FIB, e B/O foram os tipos de *replicons* mais prevalentes observados, representando 38%, 36%, e 34% dos isolados *mcr* positivos, respectivamente.

Um estudo conduzido por Kobs et al. [80], demonstrou a presença do gene de resistência à polimixina em animais de estimação. Na sua análise, este estudo identificou os primeiros isolados de *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. portadores de *mcr-1*

recuperados de cães e gatos. Foi identificado um total de 64 isolados bacterianos com resistência fenotípica à polimixina B, dos quais 62 isolados eram de cães e dois de gatos. Além disso, todos os isolados positivos de *mcr-1* foram MDR. Dessa forma, esse resultado serve como um importante alerta à medicina veterinária em relação à resistência bacteriana.

Além disso, Ramos et al. [85] caracterizaram 216 cepas de *E. coli* isoladas de cães alimentados com uma dieta à base de carne crua (RMDB) ou com uma ração seca convencional. Os isolados de cães alimentados com RMDB foram frequentemente positivos para *E. coli* MDR, e entre eles, sete produtores de ESBL foram identificados e submetidos a sequenciamento de todo o genoma. O *mcr-1* foi considerado positivo em duas cepas ST57 e ST410. Além disso, uma pesquisa BLAST das regiões dos genes ESBL e *mcr-1* revelou que a maioria deles estavam localizados em componentes genéticos móveis de vários tipos de *replicons*, incluindo o plasmídeo IncFII. Portanto, este estudo revelou que devido ao risco de propagação destas bactérias tanto dentro do lar como na comunidade, as estirpes de *E. coli* ESBL e *mcr-1* positivas representam um risco potencial não só para os cães portadores, mas também para outros animais e humanos nas proximidades.

Incidência do *mcr* Gene no Ambiente

A incidência do gene *mcr* nos agentes patogênicos que produzem ESBL e carbapenemases de origem ambiental (Tabela IV), é motivo de preocupação para a comunidade científica [86]. Sacramento et al. [86] descreveram a presença dos genes *mcr-1* e *bla_{CTX-M-8}* em isolados de *E. coli* recuperados de um ecossistema de manguezais na região Nordeste do Brasil. Neste estudo, foi descrita a presença dos plasmídeos IncI1, IncX1, IncFII, IncFIB e IncX4. O gene de resistência à colistina foi transportado pelo plasmídeo IncX4, corroborando o conceito deste plasmídeo como um dos principais agentes de disseminação de genes em enterobactérias [63]. Além disso, a identificação de agentes patogênicos com mais de um gene de resistência, especialmente os que apresentavam a variante *mcr-9.1*, representou um sinal de maior propagação do gene *mcr* [84].

Cordeiro-moura et al. [87] detectaram a presença de *mcr-1* em uma cepa de *E. coli* isolada de uma amostra de rio em João Pessoa, Paraíba, como parte de um projeto para analisar a resistência bacteriana em águas costeiras. A cepa portadora do gene apresentou CIM para colistina de 4 µg/mL. Além disso, foram identificados os plasmídeos IncX4, IncN, IncI1/Iy, IncF e IncFIB no isolado, no qual o gene foi identificado como pertencente ao grupo de incompatibilidade IncX4. Do mesmo modo, Fernandes et al. [63] detectaram a presença do gene *mcr-1* mediado pelo plasmídeo IncX4 e gene o *bla_{CTX-M}* em *E. coli* isoladas das águas

costeiras da cidade de São Paulo.

Considerações Finais

Devido à sua ampla disseminação, a resistência bacteriana tornou-se um desafio para a comunidade científica. Os BGN-MDR estão presentes principalmente em casos clínicos. Infelizmente, o desenvolvimento de medicamentos eficazes não acompanha as taxas de prevalência de estirpes MDR, mesmo os antimicrobianos que têm alta atividade contra Gram-negativos, como as polimixinas, tornaram-se ineficazes no tratamento de infecções. Neste contexto, o presente estudo realça a importância do conceito *One Health* no controle da propagação da RAM, enfatizando a influência da saúde animal e do ambiente na prevalência, e a propagação de genes de resistência bacteriana. A trajetória da incidência do gene *mcr* nas bactérias Gram-negativas do Brasil pode ser usada como exemplo da necessidade de estudos que destaquem e utilizem a abordagem *One Health*, além da importância da epidemiologia molecular no controle da resistência bacteriana. Além disso, o cenário pandêmico que começou em 2019 será possivelmente um grande acelerador da propagação de bactérias resistentes no Brasil.

Referências

1. Cruz-López F, Villarreal-Treviño L, Camacho-Ortiz A, et al (2020) Acquired Genetic Elements that Contribute to Antimicrobial Resistance in Frequent Gram-Negative Causative Agents of Healthcare-Associated Infections. *Am. J. Med. Sci.* 360:631–640. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2020.06.028>
2. Bedos JP, Daikos G, Dodgson AR, et al (2021) Early identification and optimal management of carbapenem-resistant Gram-negative infection. *J. Hosp. Infect.* 108:158–167. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.12.001>
3. Durand GA, Raoult D, Dubourg G (2019) Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents* 53:371–382. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>
4. Neto LVP, Oliveira MS, Orsi TD, et al (2020) Alternative drugs against multiresistant Gram-negative bacteria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 23:33–37. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.07.025>

5. Diekema DJ, Hsueh P-R, Mendes RE, et al (2019) The Microbiology of Bloodstream Infection: 20-Year Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63: <https://doi.org/10.1128/aac.00355-19>
6. Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, et al (2014) Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect. Dis.* 14:742–750. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(14\)70780-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(14)70780-7)
7. Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Fazly Bazzaz BS (2016) Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb. Pathog.* 95:32–42. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.009>
8. Brown ED, Wright GD (2016) Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature* 529:336–343. <https://doi.org/10.1038/nature17042>
9. Brown P, Abdulle O, Boakes S, et al (2020) Direct modifications of the cyclic peptide Polymyxin B leading to analogues with enhanced in vitro antibacterial activity. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 30:127163. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127163>
10. Harris PNA, Tambyah PA, Lye DC, et al (2018) Effect of Piperacillin-Tazobactam vs Meropenem on 30-Day Mortality for Patients With *E. coli* or *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infection and Ceftriaxone Resistance. *JAMA* 320:984. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.12163>
11. Jayol A, Kieffer N, Poirel L, et al (2018) Evaluation of the Rapid Polymyxin NP test and its industrial version for the detection of polymyxin-resistant *Enterobacteriaceae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 92:90–94. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.006>
12. Roberts KD, Azad MAK, Wang J, et al (2015) Antimicrobial Activity and Toxicity of the Major Lipopeptide Components of Polymyxin B and Colistin: Last-Line Antibiotics against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *ACS Infect. Dis.* 1:568–575. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00085>
13. Pogue JM, Ortwine JK, Kaye KS (2016) Are there any ways around the exposure-limiting nephrotoxicity of the polymyxins? *Int. J. Antimicrob. Agents* 48:622–626. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.001>.
14. Falagas ME, Skolidis T, Vardakas KZ, Legakis NJ (2017) Activity of cefiderocol (S-649266) against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria collected from

- inpatients in Greek hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 72:1704–1708.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkx049>.
15. Ho J, Tambyah PA, Paterson DL (2010) Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 23:546–553.
<https://doi.org/10.1097/qco.0b013e32833f0d3e>
 16. Poirel L, Jayol A, Nordmann P (2017) Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* 30:557–596. <https://doi.org/10.1128/cmr.00064-16>
 17. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, et al (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 16:161–8.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
 18. Xu Y, Wei W, Lei S, et al (2018) An Evolutionarily Conserved Mechanism for Intrinsic and Transferable Polymyxin Resistance. *mBio* 9:
<https://doi.org/10.1128/mbio.02317-17>
 19. Xavier BB, Lammens C, Ruhul R, et al (2016) Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance* 21: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2016.21.27.30280>
 20. Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA, et al (2016) First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the *mcr-1* Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a Human Infection in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60:6415–6417. <https://doi.org/10.1128/aac.01325-16>.
 21. Zamparetti CP, Schorner M, Campos E, et al (2020) IncX4 Plasmid-Mediated *mcr-1.1* in Polymyxin-Resistant *Escherichia coli* from Outpatients in Santa Catarina, Southern Brazil. *Microb. Drug Resist.* 26:1326–1333. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0203>.
 22. Rossi F, Girardello R, Morais C, et al (2017) Plasmid-mediated *mcr-1* in carbapenem-susceptible *Escherichia coli* ST156 causing a blood infection: an unnoticeable spread of colistin resistance in Brazil? *Clinics* 72:642–644.
[https://doi.org/10.6061/clinics/2017\(10\)09](https://doi.org/10.6061/clinics/2017(10)09)
 23. Keyser P, Elofsson M, Rosell S, Wolf-Watz H (2008) Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria. *J. Intern. Med.* 264:17–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.01941.x>

24. Wu H-J, Wang AH-J, Jennings MP (2008) Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* 12:93–101.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.023>
25. Dumaru R, Baral R, Shrestha LB (2019) Study of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of gram-negative Bacilli among the clinical isolates at BPKIHS, Dharan. *BMC Res. Notes* 12: <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4084-8>
26. Nordmann P, Naas T, Poirel L (2011) Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1791–1798.
<https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
27. Mota FS, Oliveira HA, Souto RCF (2018) Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva - Revista RBAC. *RBAC* 50:270–277.
<https://doi.org/https://doi.org/10.21877/2448-3877.201800740>
28. Munita JM, Arias CA (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* 4 <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
29. Tenover FC (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Infect. Control* 34:S3–S10. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.219>
30. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, et al (2014) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13:42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>.
31. Carattoli A (2009) Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:2227–2238. <https://doi.org/10.1128/aac.01707-08>
32. Leavitt A, Chmelnitsky I, Ofek I, et al (2009) Plasmid pKpQIL encoding KPC-3 and TEM-1 confers carbapenem resistance in an extremely drug-resistant epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:243–248.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkp417>
33. Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Fazly Bazzaz BS (2016) Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb. Pathog.* 95:32–42. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.009>

34. Nang SC, Li J, Velkov T (2019) The rise and spread of mcr plasmid-mediated polymyxin resistance. *Crit. Rev. Microbiol.* 45:131–161.
<https://doi.org/10.1080/1040841x.2018.1492902>
35. Giamarellou H (2016) Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48:614–621.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.025>
36. Lima WG, Alves MC, Cruz WS, Paiva MC (2018) Chromosomally encoded and plasmid-mediated polymyxins resistance in *Acinetobacter baumannii*: a huge public health threat. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 37:1009–1019.
<https://doi.org/10.1007/s10096-018-3223-9>
37. Khondker A, Rheinstädter MC (2020) How do bacterial membranes resist polymyxin antibiotics? *Commun. Biol.* 3:1–4. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0803-x>.
38. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL (2007) Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J. Antimicrob. Chemother.* 60:1206–1215. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm357>
39. Velkov T, Thompson PE, Nation RL, Li J (2010) Structure–Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *J. Med. Chem.* 53:1898–1916.
<https://doi.org/10.1021/jm900999h>
40. Ortwine JK, Kaye KS, Li J, Pogue JM (2014) Colistin: Understanding and Applying Recent Pharmacokinetic Advances. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 35:11–16. <https://doi.org/10.1002/phar.1484>
41. Martin NI, Hu H, Moake MM, et al (2003) Isolation, Structural Characterization, and Properties of Mattacin (Polymyxin M), a Cyclic Peptide Antibiotic Produced by *Paenibacillus kobensis* M. *J. Biol. Chem.* 278:13124–13132.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m212364200>
42. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK (2010) Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist. Updat.* 13:132–138.
<https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.05.002>.

43. Nikoo HR, Ardebili A, Mardaneh J (2017) Systematic Review of Antimicrobial Resistance of Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates in Iran: An Update. *Microb. Drug Resist.* 23:744–756. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0118>
44. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, et al (2013) Pharmacology of polymyxins: new insights into an “old” class of antibiotics. *Future Microbiol.* 8:711–724. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.39>.
45. Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, et al (2013) A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J. Antibiot.* 67:147–151. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.111>
46. Maalej S, Meziou M, Mahjoubi F, Hammami A (2012) Epidemiological study of *Enterobacteriaceae* resistance to colistin in Sfax (Tunisia). *Med Mal Infect.* 42:256–263. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.04.008>.
47. Kaye KS, Pogue JM, Tran TB, et al (2016) Agents of Last Resort: Polymyxin Resistance. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 30:391–414. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.005>.
48. Trimble MJ, Mlynářčík P, Kolář M, Hancock REW (2016) Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025288>.
49. Girardello R, Gales AC (2012) Resistência às Polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção* 2:66. <https://doi.org/10.17058/reci.v2i2.2504>
50. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, et al (2011) PhoQ Mutations Promote Lipid A Modification and Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Found in Colistin-Treated Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:5761–5769. <https://doi.org/10.1128/aac.05391-11>.
51. Anandan A, Evans GL, Condic-Jurkic K, et al (2017) Structure of a lipid A phosphoethanolamine transferase suggests how conformational changes govern substrate binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114:2218–2223. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612927114>.

52. Wanty C, Anandan A, Piek S, et al (2013) The Structure of the Neisserial Lipooligosaccharide Phosphoethanolamine Transferase A (LptA) Required for Resistance to Polymyxin. *J. Mol. Biol.* 425:3389–3402.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.06.029>.
53. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P (2017) Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 49:526–535.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.029>.
54. Di Pilato V, Arena F, Tascini C, et al (2016) mcr-1.2 , a New mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60:5612–5615. <https://doi.org/10.1128/aac.01075-16>.
55. Yin W et al (2017) Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. *MBio* 8(3):e00543–e617.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00543-17>.
56. Carretto E et al (2018) Detection of mcr-4 positive *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in clinical isolates of human origin, Italy, October to November 2016. *Eurosurveillance* 23(2):17–00821. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.2.17-00821>
57. Borowiak M et al (2017) Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolaminetransferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi* B. *J Antimicrob Chemother* 72(12):3317–3324. doi: 10.1093/jac/dkx327.
58. AbuOun M et al (2017) mcr-1 and mcr-2 variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J Antimicrob Chemother* 72(10):2745–2749. doi: 10.1093/jac/dky272.
59. Yang Y-Q et al (2018) Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 73(7):1791–1795. doi: 10.1093/jac/dky111.

60. Wang X et al (2018) Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect* 7(1):1–9. doi: 10.1038/s41426-018-0124-z.
61. Carroll LM et al (2019) Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin susceptible *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* isolate. *mBio*. 2019 May 7;10(3):e00853-19. doi: 10.1128/mBio.00853-19
62. Wang C et al (2020) Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect* 9(1):508–516. doi: 10.1080/22221751.2020.1732231.
63. Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, et al (2016b) Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Eurosurveillance* 21: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2016.21.17.30214>
64. Dalmolin TV, Martins AF, Zavaski AP, et al (2018) Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 90:132–133. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.016>.
65. Girardello R, Piroupo CM, Martins J, et al (2021) Genomic Characterization of *mcr-1.1*-Producing *Escherichia coli* Recovered From Human Infections in São Paulo, Brazil. *Frontiers in Microbiology* 12: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663414>
66. Vasconcelos PC, Leite EL, Araújo WJ, et al (2020) Draft genome sequence of *mcr-1*-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* ST359 from chicken carcasses in Northeastern Brazil. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 23:135–136. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.08.016>.
67. Conceição-Neto OC, Aires CAM, Pereira NF, et al (2017) Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *Int. J. Antimicrob. Agents* 50:282–284. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.05.003>
68. Aires CAM, da Conceição-Neto OC, Tavares e Oliveira TR, et al (2017) Emergence of the Plasmid-Mediated *mcr-1* Gene in Clinical KPC-2-Producing *Klebsiella*

- pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. Antimicrob. Agents Chemother. 61: <https://doi.org/10.1128/aac.00317-17>.
69. Nitz F, de Melo BO, da Silva LCN, et al (2021) Molecular Detection of Drug-Resistance Genes of blaOXA-23-blaOXA-51 and mcr-1 in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microorganisms 9:786. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040786>
 70. Rocha IV, dos Santos Silva N, das Neves Andrade CA, et al (2020) Diverse and emerging molecular mechanisms award polymyxins resistance to *Enterobacteriaceae* clinical isolates from a tertiary hospital of Recife, Brazil. Infect. Genet. Evol. 85:104584. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104584>
 71. Kieffer N, Nordmann P, Moreno AM, et al (2018) Genetic and Functional Characterization of an MCR-3-Like Enzyme-Producing *Escherichia coli* Isolate Recovered from Swine in Brazil. Antimicrob. Agents Chemother. 62: <https://doi.org/10.1128/aac.00278-18>.
 72. Martins-Sorenson N, Snesrud E, Xavier DE, et al (2019) A novel plasmid-encoded mcr-4.3 gene in a colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. J. Antimicrob. Chemother. 75:60–64. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz413>
 73. Silveira LS (2019) Investigação do gene *mcr-1* em isolados resistentes à colistina na região de Santa Maria-RS. Disciplinarum Scientia | Saúde 20:341–352.
 74. dos Santos LDR, Furlan JPR, Ramos MS, et al (2020) Co-occurrence of mcr-1, mcr-3, mcr-7 and clinically relevant antimicrobial resistance genes in environmental and fecal samples. Arch. Microbiol. 202:1795–1800. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01890-3>
 75. Leite EL, Araújo WJ, Vieira TR, et al (2020) First genome of a mcr-9-mediated colistin-resistant *Salmonella typhimurium* from Brazilian livestock. J. Glob. Antimicrob. Resist. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.09.012>
 76. Grinbaum RS, Kiffer CRV (2021). Bacterial infections in COVID-19 patients: a review. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 67, n. 12, p. 1863–1868. • <https://doi.org/10.1590/1806-9282.20210812>
 77. 83. Palmeira JD, Ferreira H, Madec J-Y, Haenni M (2018) Draft genome of a ST443 *mcr-1* - and bla CTX-M-2 -carrying *Escherichia coli* from cattle in Brazil. J. Glob. Antimicrob. Resist. 13:269–270. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.05.010>.
 78. Fuentes-Castillo D, Sellera FP, Goldberg DW, et al (2020) Colistin-resistant *Enterobacter kobei* carrying *mcr-9.1* and bla CTX-M-15 infecting a critically

- endangered franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*), Brazil. Transbound. Emerg. Dis. <https://doi.org/10.1111/tbed.13980>.
79. Rau RB, de Lima-Morales D, Wink PL, et al (2020) *Salmonella enterica mcr-1* Positive from Food in Brazil: Detection and Characterization. Foodborne Pathog. Dis. 17:202–208. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2700>
 80. Kobs VC, Valdez RE, Medeiros F de, et al (2020) *mcr-1*-carrying *Enterobacteriaceae* isolated from companion animals in Brazil. Pesqui. Vet. Bras. 40:690–695. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6635>.
 81. Moreno LZ, Gomes VTM, Moreira J, et al (2019) First report of *mcr-1*-harboring *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolated from poultry meat in Brazil. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 93:376–379. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.016>
 82. Saidenberg ABS, Stegger M, Price LB, et al (2020) *mcr*-Positive *Escherichia coli* ST131-H22 from Poultry in Brazil. Emerg. Infect. Dis. 26:1951–1954. <https://doi.org/10.3201/eid2608.191724>
 83. Pontes L da S, Pimenta R, Silveira MC, et al (2020) *Escherichia fergusonii* Harboring IncHI2 Plasmid Containing *mcr-1* Gene: A Novel Reservoir for Colistin Resistance in Brazil. Microb. Drug Resist.. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0041>.
 84. Barbieri NL, Pimenta RL, de Melo DA, et al (2021) *mcr-1* Identified in Fecal *Escherichia coli* and Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) From Brazil. Frontiers in Microbiology 12: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.659613>
 85. Ramos CP, Kamei CYI, Viegas FM, et al (2022) Fecal Shedding of Multidrug Resistant *Escherichia coli* Isolates in Dogs Fed with Raw Meat-Based Diets in Brazil. Antibiotics 11:534. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040534>
 86. Sacramento AG, Fernandes MR, Sellera FP, et al (2018) Genomic analysis of MCR-1 and CTX-M-8 co-producing *Escherichia coli* ST58 isolated from a polluted mangrove ecosystem in Brazil. J. Glob. Antimicrob. Resist. 15:288–289. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.10.024>
 87. Cordeiro-Moura JR, Kraychete GB, Longo LG de A, et al (2022) Description and comparative genomic analysis of a *mcr-1*-carrying *Escherichia coli* ST683/CC155 recovered from touristic coastal water in Northeastern Brazil. Infect Genet Evol 97:105196. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105196>

Tabelas

Tabela I. Variantes do gene *mcr* envolvidas na resistência à polimixina, ano, localização, plasmídeo e origem da amostra biológica.

Tabela II. Estudos relevantes sobre a presença do gene *mcr* em amostras isoladas de seres humanos entre 2016 e 2020 no Brasil.

Tabela III. Estudos relevantes sobre a presença do gene *mcr* em amostras isoladas de animais e carne de varejo entre 2018 e 2020 no Brasil.

Tabela IV. Estudos sobre a presença do gene *mcr* em amostras ambientais entre 2017 e 2019 no Brasil.

Tabela I.

<i>mcr</i> gene	Species	Genes of β -lactamases	MIC of Colistin (mg/L)	Origin	Year*	Country	References
<i>mcr-1</i>	<i>E. coli</i>	ND**	8	Animal, Human and Food	2015	China	[17]
<i>mcr-2</i>	<i>E. coli</i>	ND**	4-8	Animal	2011-2012	Belgium	[19]
<i>mcr-3</i>	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{OXA-1}	8	Animal	2015	China	[55]
<i>mcr-4</i>	<i>E. coli</i> and <i>Salmonella</i>	ND**	8	Animal	2016-2017	Italy, Spain and Belgium	[56]
<i>mcr-5</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>bla</i> _{TEM-1b}	4-8	Animal, Food	2011-2013	Germany	[57]
<i>mcr-6</i>	<i>Moraxella pluranimalium</i>	<i>bla</i> _{BRO-1}	2-4	Animal	2014-2015	UK	[58]
<i>mcr-7.1</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{SHV-28} ; <i>bla</i> _{CTX-M-55}	4	Animal	2014	China	[59]
<i>mcr-8</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{SHV-1} ; <i>bla</i> _{NDM-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-14} ; <i>bla</i> _{NDM-5}	16	Animal	2015-2017	China	[60]
<i>mcr-9</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B} ; <i>bla</i> _{SHV-12}	5	Human	2010	USA	[61]
<i>mcr-10</i>	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	<i>bla</i> _{MIR-5}	2	Human	2016	China	[62]

*Year of first gene isolation.

**ND: Not detected.

Tabela II.

Gene	Year	City/Region	Sample	Specie	Plasmid	References
<i>mcr-1</i>	2016	Northeastern Brazilian Region	Soft tissue	<i>E. coli</i> (ST-101)	IncX4	[63]
<i>mcr-1.1</i>	2015 -2016	Santa Catarina	Blood	<i>E. coli</i> (ST-206, ST-354)	IncX4	[21]
<i>mcr-1</i>	2016	São Paulo	Blood	<i>E. coli</i> (ST-156)	IncX4	[22]
<i>mcr-1</i> and <i>bla</i> _{KPC-2}	2014	Porto Alegre	Rectal Swab	<i>K. pneumoniae</i> (ST-437)	IncX4	[64]
<i>mcr-1</i>	2016	Vitória	Urine	<i>K. pneumoniae</i> (ST-392)	IncX4	[68]
<i>mcr-1</i> and <i>mcr-5</i>	2016	Recife	Blood	<i>Enterobacter</i>	IncX4 and Inc	[70]
<i>mcr-4.3</i>	2008	Brazil	Blood	<i>Acinetobacter baumannii</i> (597A)	pAb-MCR4.3	[71]
<i>mcr-1</i>	2016 - 2017	Paraná	Others	<i>K. pneumoniae</i> and <i>E. coli</i>	Undetermined	[72]
<i>mcr-1</i>	2017 - 2018	Santa Maria	Feces	<i>Enterobacteriaceae</i>	Undetermined	[73]

*Year of first isolament.

Tabela III.

Genes	Year*	City/Region	Origin of the sample	Specie	Plasmid	References
<i>mcr-1</i>	2017 – 2018	Santa Catarina	Domestic animals (cat and dog)	<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp. and <i>Pseudomonas</i> spp.	Undetermined	[80]
<i>mcr-1</i>	Not informed	Northeastern Brazilian Region	Chicken carcass	<i>E. coli</i> (ST-359)	IncX4	[66]
<i>mcr-9.1 - bla_{CTX-M-15}</i>	2019	Angra dos Reis	Dolphin respiratory exudate culture	<i>Enterobacter kobei</i> (E11R)	IncHI2 - IncHI2A	[78]
<i>mcr-1 - bla_{CTX-M-2}</i>	2014	Northeastern Brazilian Region	Bird and swine meat	<i>E. coli</i> (E12)	IncX4/IncF	[77]
<i>mcr-9</i>	2017	Southern Brazilian Region	Swine samples	<i>S. typhimurium</i> (ST-19)	IncHI2, IncHI2A e pN1566-2	[75]
<i>mcr-1</i>	2014 – 2017	Brazil	Sample of retail poultry, turkey and pork meat and carcass	<i>Salmonella entérica</i>	IncX4	[79]
<i>mcr-1</i>	2013 – 2016	São Paulo	Bird meat	<i>Salmonella enterica</i> sorovar <i>Schwarzengrund</i> (ST-96)	IncX4	[81]
<i>mcr-5.1</i> and <i>mcr-9</i>	2019	São Paulo	Domestic birds	<i>E. coli</i> (ST131-H22)	Undetermined	[82]
<i>mcr-3.12</i>	2018	Minas Gerais	Swine feces	<i>E. coli</i> (ST-641)	IncA/C ₂	[71]
<i>mcr-1</i>	2019	Rio de Janeiro	Bird cloacal swabs	<i>Escherichia fergusonii</i>	IncHI2	[83]

*Year of first isolament.

Tabela IV.

Genes	Year	City/Region	Sample	Specie	Plasmid	References
<i>mcr-1 - bla_{CTX-M-8}</i>	2017	Northeastern Brazilian Region	Mangrove water	<i>E. coli</i> (ECEST9)	IncI1, IncX1, IncFII, IncFIB and IncX4	[86]
<i>mcr-1</i> , <i>mcr-3</i> and <i>mcr-7</i>	2019	Minas Gerais	Environmental feces samples (soil and water)	<i>Enterobacter</i>	IncY	[73]

*Year of first isolament.

Figuras

Figura 1. Representação da atividade proteica da MCR-1. A) Estrutura original do lipídio A encontrado nas bactérias Gram-negativas; B) Modificação desta molécula após a ação da proteína codificada pelo gene *mcr-1*, caracterizada pela adição de fosfoetanolamina ao grupo 1-(4')-fosfato do lipídio A.

Figura 2. Distribuição das variantes do gene *mcr* no Brasil.

Figura 1.

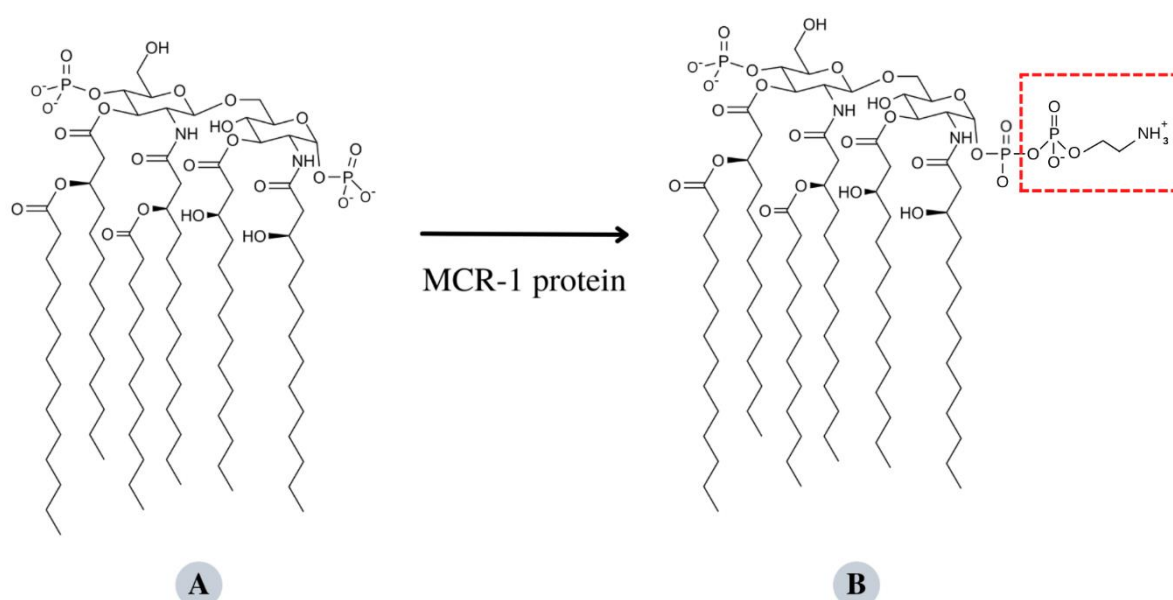
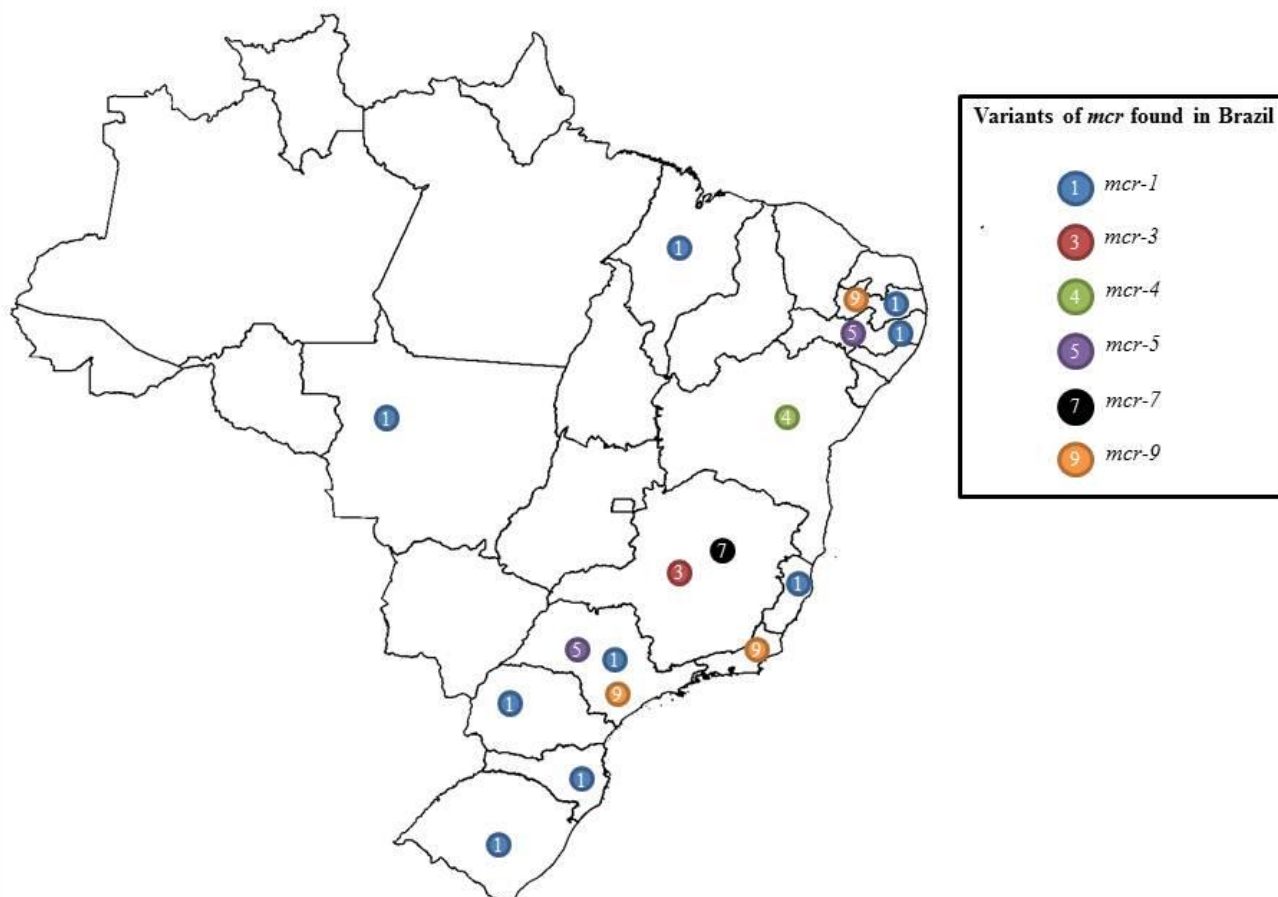


Figura 2.



4.3 ARTIGO 3: Disseminação de cepas de *Escherichia coli* resistentes e produtoras de biofilme em aves da espécie *Caracara plancus* no Nordeste do Brasil

O manuscrito intitulado “**Disseminação de cepas de *Escherichia coli* resistentes e produtoras de biofilme em aves da espécie *Caracara plancus* no Nordeste do Brasil**” será submetido na revista *Environmental Pollution* (1987).

Disseminação de cepas de *Escherichia coli* resistentes e produtoras de biofilme em aves da espécie *Caracara plancus* no Nordeste do Brasil

Autores: Sérgio Dias Costa-Júnior^{1*}; João Marcos Araújo da Silva²; Vinicius Pietta Perez^{1,3};

Pedro Cerqueira Lima⁴; Tânia Freitas Raso⁵; Celso José Bruno de Oliveira⁶; Eloiza Helena Campana^{2,3}; Maria Betânia Melo de Oliveira⁷

Instituições: ¹Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58.051-900, João Pessoa, Brasil; ²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58.051-900, João Pessoa, Brasil; ³Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58.051-900, João Pessoa, Brasil; ⁴Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), 40110-909, Salvador, Brasil; ⁵Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMZV), Universidade de São Paulo (USP), 05508-270, São Paulo, Brasil. ⁶Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA), Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58397-000, Areia, Brasil; ⁷Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Moraes Rego s/n, Recife, PE, Brasil;

RESUMO

Caracara Plancus são animais que podem atuar na disseminação de bactérias Multidroga-Resistentes (MDR) nos grandes centros urbanos em países da América Latina. No entanto, no Brasil, estudos relacionados a investigação de bactérias resistentes e o perfil de disseminação entre animais dessa espécie, ainda são escassos. Esta pesquisa teve como objetivo caracterizar a microbiota de 87 aves da espécie *C. plancus* no nordeste brasileiro e investigar o perfil de resistência e genotípico da espécie prevalente, bem como seu potencial de formação de biofilme. Para isso, foram coletados 87 swabs obtidos da cloaca de *C. plancus*, no ano de 2019, no estado da Bahia, nordeste do Brasil. As bactérias foram caracterizadas quanto a fermentação de lactose e morfologia das colônias em meio MacConkey e identificadas molecularmente pela *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight* (MALDI-TOF-MS). Após esta triagem, colônias da espécie predominante foram submetidas ao teste de disco-difusão em ágar, de acordo com o protocolo do *Clinical Laboratory and Stanrd Institute* (CLSI), seguido do ensaio fenotípico de disco-aproximação. Posteriormente, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de 26 genes de betalactamases e do gene de resistência à colistina mediada por plasmídeo (*mcr-1*). A *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – PCR* (ERIC-PCR) foi utilizada para determinar o perfil clonal dos isolados. Por fim, foram aplicados e comparados os métodos de coloração com Cristal Violenta (CV) e crescimento em meio vermelho-congo para analisar a capacidade de produção de biofilme. Como resultado inicial foram obtidos 104 microrganismos, pertencentes a diferentes gêneros bacterianos e um gênero fúngico. Destes, o mais prevalente foi o *Escherichia* representado por 39 isolados, dos quais 15.4% (6/39) foram produtores de Betalactamases de Espectro Estendido (ESBL) e 33.3% (13/39) resistentes a pelo menos um dos 14 antimicrobianos testados. As análises moleculares detectaram positividade de: 18% (7/39) para o gene *bla*_{CTX-M-1/2}, 7.7% (3/39) para o *bla*_{OXA-1}, 2.6% (1/39) para o *bla*_{KPC}, 2.6%

(1/39) para o *bla*_{OXA-18}, e 2.6% (1/39) para o *bla*_{GES}. Este é o primeiro relato de *E. coli* portadora de *bla*_{KPC} com susceptibilidade aos carbapenêns em amostras de origem animal. Não foram detectadas cepas portadoras do gene *mcr-1* em nenhuma das amostras investigadas. O resultado da genotipagem demonstrou disseminação de cepas portadoras de genes de resistência aos betalactâmicos em diferentes aves. Em relação a capacidade de formação de biofilme, 74.3% (29/39) das cepas foram produtoras de biofilme pelo método CV, apresentando índice de concordância de 76.9% ao método vermelho-congo. Os dados indicam que a espécie *C. plancus* pode ser um potencial disseminador de bactérias resistentes nos centros urbanos do nordeste do Brasil e que ações de monitoramento são necessárias para auxiliar os órgãos ambientais e de saúde a atuarem de forma estratégica e preventiva no combate a Resistência Antimicrobiana (RAM).

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana; Betalactamases; Perfil Clonal; Centros Urbanos.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Caracara plancus* (Miller, 1777), pertence ao filo Chordata, classe Aves, ordem Falconiformes, família *Falconidae* e gênero *Caracara*. Esta ave possui distribuição na América-latina principalmente na Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Peru e Uruguai. No Brasil, é popularmente conhecida como Carcará e amplamente encontrada na região sudeste e nordeste do país. O processo de adaptação dessa ave de rapina aos efeitos antropogênicos, principalmente ao desmatamento, acarretou no aumento da sua incidência no ambiente urbano (LIMA et al., 2022). Entre as causas mais comuns de morbimortalidade desses animais, estão as doenças infecto-parasitárias. Além de serem acometidos por infecções causadas por microrganismos, aves podem ser consideradas como potenciais reservatórios e disseminadores de bactérias (SILVA et al., 2020). Sendo, portanto, necessário a realização de pesquisas que avaliem a microbiota cloacal desses animais buscando compreender a dinâmica de dispersão de microrganismos resistentes e interrelacionando a tríplice: humanos, animais e meio ambiente, como alternativa para combater a disseminação da RAM (SILVA et al., 2020; SILVA et al., 2021, COSTA-JÚNIOR et al., 2022).

A detecção das bactérias da ordem Enterobacterales em animais pode ser considerada como um grande problema de saúde pública, pelo potencial zoonótico desses microrganismos. Alguns estudos encontraram bactérias Gram-negativas Multidroga-Resistentes (BGN-MDR) e produtoras de biofilme em aves do gênero *C. plancus* (WHO, 2017; SILVA et al., 2020; BALDOTTO et al., 2021). A colibacilose, infecção causada pela bactéria *Escherichia coli* é uma bacteriose que afeta diversas espécies de animais, como bezerros, aves e porcos, sendo considerada a principal infecção bacteriana em aves e uma das mais prevalentes em bovinos (COSTA-JÚNIOR et al., 2018). No entanto, a maioria

dessas cepas vivem em relação comensal com as aves, sendo consideradas agentes colonizadores. Cepas virulentas referidas como *E. coli* Patogênica Aviária (APEC) induzem infecções localizadas e sistêmicas nestes animais e configuram um problema grave a ser enfrentado (COSTA-JÚNIOR et al., 2018; SILVA et al., 2020).

Nos últimos anos, a disseminação de cepas com mecanismos de resistência a antimicrobianos é alvo de diversos estudos, onde se observa um papel crucial de reservatórios animais na dispersão e seleção de cepas com múltiplos mecanismos de resistência a diferentes classes de antimicrobianos e virulência, possibilitando a sobrevivência e permanência destes patógenos no ambiente por um período mais prolongado (SILVA et al., 2016; SILVA et al., 2020; SILVA et al., 2021). A expressão de enzimas hidrolíticas e a produção de biofilmes são exemplos de mecanismos pelos quais existem um número crescente de relatos de cepas de *E. coli* resistentes as principais antibióterapias frequentemente utilizadas na clínica (VON WINTERSDORFF, 2016; OLIVEIRA SANTOS et al., 2022). A produção de biofilme por cepas de *E. coli* é um fator de virulência que merece destaque, uma vez que esta é uma das principais causas da eficiência desses microrganismos nas infecções do trato urinário em humanos (ALAV, SUTTON, RAHMAN, 2018).

Neste intuito, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a microbiota cloacal de aves do *C. plancus* ocorrentes no estado da Bahia, Nordeste do Brasil, e avaliar as características bioquímicas e genéticas da espécie prevalente a fim de entender a dinâmica de dispersão deste microrganismo por esta espécie e contribuir para o controle preventivo da RAM na região.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2. 1 Coleta e Preparo das Amostras

Com o auxílio do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis Brasileiros (IBAMA) de Salvador-BA, licença SISBIO nº 33203. Foram coletados 87 *swabs* em cloaca de *C. plancus*, resgatadas. Os animais estudados apresentavam-se clinicamente saudáveis, tendo faixas etárias diferentes. Os *swabs* coletados foram imediatamente inoculados em meio Stuart 5% e transportadas ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas do *Campus I* da UFPB, sob condições de refrigeração adequadas para isolamento de bactérias aeróbias.

2.2 Processamento das Amostras

Todas as amostras obtidas foram inicialmente inoculadas em meio *SkimMilk, Tryptone, Glucose and Glycerin* (STGG) e mantidas em estufas bacteriológicas a 37 °C/2 h, para reativação. Em seguida, estas foram reativadas e homogeneizadas por 1 min em vórtex. Foram utilizados 100 µL para semeio em placas descartáveis contendo Agar MacConkey acrescido de três antimicrobianos seletivos: imipenem (1 µg/mL), sulfato de colistina (3,5 µg/mL) e ceftriaxona (8 µg/mL) e incubados em condições de aerobiose a 37 °C/*overnight*. Colônias foram selecionadas a partir de suas características morfológicas e fermentação de lactose, as quais foram transferidas para placas contendo ágar MacConkey acrescidas dos mesmos antimicrobianos e condições de incubação das suas placas originais. Após o crescimento, todos os isolados foram rotulados e armazenados em duplicata em criotubos estéreis contendo meio Tryptic Soy Broth (TSB) e glicerina a 15%. Estes foram armazenados em *ultrafreezer*, com temperatura média de -80 °C.

2.3 Identificação Bacteriana

As bactérias foram inicialmente caracterizadas quanto a capacidade de fermentação de lactose e morfologia das colônias e posteriormente identificadas pelo método de espectrometria de massas, utilizando a técnica MALDI-TOF-MS, realizada em parceria com o Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LIMM-UFRJ). Todas as cepas foram analisadas em duplicata. Para isso, foram depositadas sobre a placa metálica fornecida pelo fabricante do equipamento, com auxílio de agulhas bacteriológicas estéreis, alíquotas de no mínimo 10⁵ células microbianas de cada uma das amostras, em dois poços distintos da placa. A cada um dos poços foi adicionado 1 µL de ácido fórmico à 70% (v/v). Estes foram mantidos em fluxo laminar para promover a completa secagem do depositado. Após este procedimento, foi adicionado em cada um dos poços 1 µL da matriz, sendo esta composta por ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico diluído em acetonitrila 50% (v/v) e ácido trifluoroacético 2,5% (v/v). A secagem da matriz depositada se deu a temperatura ambiente, sendo a placa metálica introduzida no aparelho *Bruker Daltonics Micro flex* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para leitura.

A calibração do espectrômetro de massas se deu por meio da cepa *E. coli* DH5α, inoculadas em ágar sangue, utilizada como padrão para o processamento das amostras, em duplicata. Previamente inoculadas em ágar sangue com intuito de promover o crescimento de colônias, estas foram depositadas sobre os poços da placa metálica e pré-processadas de forma idêntica ao descrito para as amostras bacterianas. Os espectros de massas gerados após

a realização do experimento foram comparados com espectros indexados no *software* *Biotyper* (versão 3.1), disponibilizado pela mesma fabricante do espectrofotômetro, para identificação do gênero e espécie das bactérias isoladas.

Uma vez caracterizada a microbiota cloacal das aves, os experimentos seguintes foram realizados exclusivamente nas cepas da espécie prevalente.

2.4 Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi determinado pela técnica de disco-difusão. Para isto, utilizou-se os seguintes antimicrobianos: Amicacina (30 µg); Amoxicilina/Ácido clavulânico (30 µg); Aztreonam (30 µg); Cefepime (30 µg); Cefoxetina (30 µg); Ceftazidima (30 µg); Ceftriaxona (30 µg); Ciprofloxacina (5 µg); Ertapenem (10 µg); Gentamicina (10 µg); Imipenem (10 µg); Meropenem (10 µg); Nitrofurantoína (300 µg) e Tetraciclina (30 µg). Foi preparado uma suspensão salina 0,85% (m/v) de cada uma das amostras correspondentes a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Com auxílio de um *swab* estéril, foi realizada a inoculação em placa contendo ágar Müller-Hinton. Em seguida, foram adicionados sobre a superfície do ágar os discos contendo os antimicrobianos e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C/overnight. Após a leitura dos resultados, classificou-se as amostras bacterianas em Sensíveis (S), Intermediárias (I) ou Resistentes (R) aos antimicrobianos testados, seguindo os critérios estabelecidos pelo CSLI para Enterobacterales (CLSI, 2019). O controle de qualidade do experimento se deu pela preparação de antibiogramas de forma semelhante descrito para as amostras, porém utilizando as cepas *E. coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

2.5 Produção de ESBL por Disco-aproximação

A determinação fenotípica da produção de ESBL foi realizada por meio da técnica de disco-aproximação (JARLIER et al., 1988). Preparou-se uma suspensão bacteriana em uma solução salina estéril 0,85% (m/v) padronizada com a solução 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Após homogeneização em vórtex, as amostras foram inoculadas com auxílio de um *swab* estéril em placas contendo ágar Muller-Hinton. Foram depositados no centro de cada uma das placas um disco de Amoxicilina/Ácido clavulânico (30µg). Perpendiculares a este, foram adicionados discos de Aztreonam (30µg), Ceftriaxona (30µg), Ceftazidima (30µg) e Cefepima (30µg) com uma distância de 25 mm do disco central.

2.6 Extração de DNA Bacteriano

As bactérias foram reativadas no Laboratório de Microbiologia Clínica do Numetrop a partir do semeio em placas de Petri de plástico contendo ágar MacConkey, incubadas por 24-48 horas em estufa a 37 °C. Após o crescimento, uma colônia pura de cada isolado foi incubada em meio caldo Infusão Cérebro-coração durante 4h a 37°C para posterior extração do DNA total. O DNA bacteriano foi extraído com o Kit PureLink Reagente (Invitrogen), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante e estocado a -20 °C.

2.7 Pesquisa dos Genes de Resistência Bacteriana

2.7.1 Detecção de Genes de Resistência aos Betalactâmicos

A caracterização molecular dos determinantes da resistência bacteriana a betalactâmicos, foi executada por meio de amplificação (PCR) de fragmentos de DNA. Foi analisada a presença dos genes de cefalosporinases mediadas por plasmídeo, oxacilinasases não carbapenemases, ESBLs, New Deli Metalo-betalactamase (NDM), *Klebisella pneumoniae* carbapenemase (KPC), e metalo-beta-lactamases. Para a detecção destes genes, cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25µL por tubo, incluindo: 10ng de DNA genômico (0,5µL), 10pmol de cada primer (1µL para cada primer), tampão 5x (5µL), 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (0,6µL), 1,5 mM MgCl₂ (1,5µL) e 2,0 U Taq DNA polimerase (0,4µL) e água ultrapura. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 0,5x, corados com o corante *Blue-Green* (Kasvi, Brasil), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados. Durante a realização das PCRs foram utilizadas cepas caracterizadas geneticamente pelo Laboratório ALERTA da Universidade Federal do Rio de Janeiro (URFJ) e como controle negativo, uma alíquota de água DNase/RNase livre (Tabela I e II).

Tabela I. Cepas controles utilizadas nas reações de PCR

ID da cepa	Genes alvos
<i>Klebsiella pneumoniae</i> A13309	<i>bla</i> _{IMP}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 48-1997A	<i>bla</i> _{SPM-1}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VIM	<i>bla</i> _{VIM}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 73-5671	<i>bla</i> _{GIM-1}
<i>Klebsiella pneumoniae</i> C262	<i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM}
KP13	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{SHV}
<i>Enterobacter</i> sp. 722	<i>bla</i> _{GES}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> OXA-18-45	<i>bla</i> _{OXA-18-45}
<i>Hafnia Alvei</i> A7307	<i>bla</i> _{AAC}
<i>Escherichia coli</i> 392	<i>bla</i> _{OXA-10}
<i>Escherichia coli</i> transconjugante 200	<i>bla</i> _{FOX-5}
<i>Escherichia coli</i> transconjugante C600 R96D	<i>bla</i> _{MIR-1}
<i>Morganella morganii</i> 386	<i>bla</i> _{DHA-1}
<i>Escherichia coli</i> 391	<i>bla</i> _{CTX-M-14}
<i>Escherichia coli</i> C115	<i>mcr-1</i>

Tabela II. Oligonucleotídeos iniciadores para a detecção de genes de betelactamases

Reação de PCR	Genes alvo	Sequência de oligonucleotídeos (5' – 3')	Tamanho (pb)	Condições de termociclagem	Referência
PCR multiplex Metabo-beta-lactamases	<i>bla_{IMP}</i>	F – (GAATAGRRRTGGCTTAAYTCTC) R – (CCAAACYACTASGTTATC)	188	Desnaturação: 94°C -10 min Desnaturação: 94 °C - 20 min Anelamento: 53 °C – 45 segundos Extensão: 72°C – 1 min 35 ciclos Extensão final: 72°C - 5 min	Mendes et al., 2007
	<i>bla_{VIM}</i>	F – (GTTTGGTCGCATACGCAAC) R – (AATGCGCAGCACCAGGATAG)	569		
	<i>bla_{GIM}</i>	F – (TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC) R – (CGGAACGACCATTTGAATGG)	72		
	<i>bla_{SPM}</i>	F – (CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG) R – (CCTTTTCCGCGACCTTGATC)	382		
PCR Single Carbapenemases	<i>bla_{KPC}</i>	F – (TCGCTAAACTCGAACAGG) R – (TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC)	762	Desnaturação: 94°C - 10 min Desnaturação: 94°C - 30 seg Anelamento: 53°C - 45 seg Extensão: 72°C – 1 min 35 ciclos Extensão final: 72°C - 10 min	Lomaestro et al., 2006
	<i>bla_{NDM}</i>	F – (GGTTTGGCGATCTGGTTTTC) R – (CGGAATGGCTCATCACGATC)	621		Poirel et al., 2011
PCR Multiplex ESBL	<i>blas_{GES}</i>	F – (AGCAGCTCAGATCGGTGTTG) R – (CCGTGCTCAGGATGAGTTG)	750	Desnaturação: 94°C - 10 min Desnaturação: 94°C - 30 seg Anelamento: 53°C - 45 seg Extensão: 72°C – 1 min 30 ciclos Extensão final: 72°C - 10 min	Nicoletti et al, 2015
	<i>bla_{TEM}</i>	F – (CCCTTATTCCCTTTYTTGCGG) R – (AACCAGCCAGCCWGAAGG)	650		
	<i>bla_{SHV}</i>	F – (CTTGACCGCTGGGAAACGG) R – (AGCACGGAGCGGATCAACGG)	200		
	<i>bla_{CTX-M-1/2}</i>	F – (ATGTGCAGYACCAGTAA) R – (CGCTGCCGGTTTATCSCCC)	512		
	<i>bla_{CTX-M-8}</i>	F – (AACRCRCAGACGCTCTAC) R – (TCGAGCCGGAASGTGTYAT)	333		
	<i>bla_{CTX-M-14}</i>	F – (GGTGACAAAGAGARTGCAACGGAT) R – (TTACAGCCCTTCGGCGATGA)	876		

PCR Multiplex Oxacinas	<i>bla</i> _{OXA-1}	F – (TATCTACAGCAGCGCCAGTG) R – (TGCACCAGTTTTCCCATACA)	601	Desnaturação: 95°C -10 min Desnaturação: 95°C - 30 seg Anelamento: 54°C - 30 seg Extensão: 72°C – 1 min 35 ciclos Extensão final: 72°C - 10 min	Nicoletti et al, 2015
	<i>bla</i> _{OXA-2}	F – (CGATAGTTGTGGCAGACGAA) R – (TCTTTGCACGCAGTATCCAG)	504		
	<i>bla</i> _{OXA-10}	F – (TGCCGAAGCCGTCAATGGTGT) R – (TGGCTCTTGGCTTTCCGTCCCA)	237		
	<i>bla</i> _{OXA-18}	F – (ATGCAACGGAGCCTGTCC) R – (GGCAGGGTGTTGAGGAACT)	206		
	<i>bla</i> _{OXA-45}	F – (GCAGATGCTCGAATGCAC) R – (GGCAATGCCTTGAGGAAG)	705		
PCR Multiplex AmpC plasmidial	<i>bla</i> _{MOX} / <i>bla</i> _{CMY-1}	F – (GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT) R – (CACATTGACATAGGTGTGGTGC)	520	Desnaturação: 94°C - 3 min Desnaturação: 94°C - 30 seg Anelamento: 64°C - 30 seg Extensão: 72°C – 1 min 25 ciclos Extensão final: 72°C - 7 min	Pérez -Pérez; Hanson, 2002.
	<i>bla</i> _{LAT} / <i>bla</i> _{CMY-2}	F – (TGGCCAGAACTGACAGGCAAA) R – (TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC)	462		
	<i>bla</i> _{MIR} / <i>bla</i> _{ACT}	F – (TYGGYAAAGCCGATRTTGCGG) R – (CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT)	302		
	<i>bla</i> _{DHA}	F – (AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT) R – (CCGTACGCATACTGGCTTTGC)	405		
	<i>bla</i> _{FOX}	F – (AACATGGGGTATCAGGGAGATG) R – (CAAAGCGCGTAACCGGATTGG)	190		
	<i>bla</i> _{AAC}	F – (AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA) R – (TTCGCCGCAATCATCCCTAGC)	346		

2.7.2 Detecção do Gene *mcr-1*

Nas reações de amplificação para o gene *mcr-1* foram utilizados os *primers* CLR5-F [5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3'] e CLR5-R [5'-CTTGGTCGGTCTGTA GGG-3'], descritos por Liu et al [2016]. Para detecção de cada um dos referidos genes, reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 µL por tubo, incluindo: 10ng de DNA genômico (0,5 µL), 10 pmol de cada *primer* (1 µL para cada primer), tampão 5x (5 µL), 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (0,6 µG), 1,5 mM MgCl₂ (1,5 µL) e 2,0 U Taq DNA polimerase (0,4 µL), além de água ultrapura. Durante estes experimentos foram incluídos como controle positivo a amostra de DNA da cepa *E. coli* C115 (ROCHA et al., 2020) e como controle negativo a amostra de DNA adicionado água. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5x corados por *Blue-Green* (Kasvi, Brasil), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados.

2.8 Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano – Reação em Cadeia da Polimerase (ERIC-PCR)

A tipagem molecular foi realizada pela técnica de Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano – Reação em Cadeia da Polimerase (ERIC-PCR) para identificar o perfil clonal das cepas investigadas. As reações ERIC-PCR foram preparadas com volume total de 25 µL por tubo, compreendendo: 100 ng de DNA genômico, 40 pmol de iniciadores (ERIC-1 [5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3']; ERIC-2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC G-3']), 1 × Bufer, 200 µM de trifosfato de desoxirribonucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase. Os parâmetros de amplificação utilizados foram de acordo com Duan et al. (2009). Os produtos da PCR foram corados por *Blue-Green* (Kasvi, Brasil), submetidos à eletroforese 1,5% em gel de agarose; visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados para posterior análise de perfil clonal. Os padrões de amplificação foram comparados ao marcador de peso molecular para genotipagem dos isolados. Estes padrões permitiram a construção de uma matriz binária submetida a uma análise filogenética detalhada. Coeficiente de similaridade, método de agrupamento, otimização e valores de tolerância foram avaliados com base em Duan et al (2009). Bandas observadas em géis de agarose foram avaliadas com base na presença (codificado 1) ou ausência (codificado 0) de fragmentos polimórficos em *primers* ERIC. A análise de cluster foi realizada em NTSYS-pc (Versão 2.20), pacote de *software* de taxonomia numérica e análise multivariada com base no coeficiente de Similaridade de Dados (SD) com posição de 1% tolerância, bem como no

método de grupo de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA). Adicionalmente, cada isolado foi considerado uma Unidade Taxonômica Operacional (OTU). Isolados apresentando 90% de similaridade foram tratados como um único isolado (DUAN et al., 2009).

2.9 Determinação da Produção de Biofilme

2.9.1 Teste de ágar Vermelho Congo

A determinação qualitativa da capacidade de produção de biofilme pelos isolados foi realizada de acordo com o método de ágar Vermelho congo, seguindo o protocolo descrito em 1989 (FREEMAN, FALKINER, KEANE, 1989). O meio ágar Vermelho congo foi preparado a partir do meio base ágar BHI, suplementado com sacarose 50 g/L. Após esterilização deste meio, foi adicionado o corante vermelho congo na concentração de 0,8 g/L. Este corante é usado como indicador de pH, mostrando coloração preta quando os valores de pH estão entre 3,0 e 5,2. Os isolados foram ajustados na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em meio caldo BHI e semeados em placas contendo o meio ágar vermelho congo. Posteriormente, foram incubados em ambiente aeróbio por 24 a 48 horas a 37 ± 2 °C. Após este período, as colônias que apresentaram coloração enegrecida, com consistência seca ou rugosa, foram consideradas como produtoras de biofilme. Colônias de coloração vermelha, com consistência mucosa, foram consideradas como não produtoras de biofilme. *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle positivo para o método e *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 como controle negativo.

2.9.2 Método de Coloração com Cristal Violeta

Inicialmente, os isolados foram semeados em BHI e incubados a 35 ± 2 °C por 24 horas. Cada cultura foi ajustada no 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em meio TSB + glicose e a suspensão bacteriana ajustada foi adicionada nos poços da placa de microdiluição. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 48 horas. Em seguida, o conteúdo dos poços foi aspirado e realizada lavagem com tampão fosfato. Posteriormente, foi adicionado metanol 99% e outra lavagem com tampão fosfato, seguida da adição do CV. A placa foi incubada novamente por 48 horas a 35 ± 2 °C. O conteúdo dos poços foi novamente removido, e estes submetidos a lavagens com tampão fosfato, nos quais foram adicionados ácido acético glacial (30%). Por fim, a Densidade Óptica (DO) foi medida por espectrometria a 570 nm (*Agilent BioTek Epoch 2 Microplate Spectrophotometer*, Winooski, EUA)

(STEPANOVIC et al., 2007). As cepas foram classificadas em quatro categorias baseado nos valores de DOs dos biofilmes bacterianos em comparação com valor da Densidade óptica do controle (DOc). Categorias: não aderente ($DO \leq DOc$), fracamente ($DOc < DO \leq 2 \times DOc$), moderadamente ($2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$) e fortemente ($4 \times DOc < DO$) produtor de biofilme (STEPANOVIC et al., 2007).

2.10 Análises Estatísticas

Os dados foram tabulados utilizando planilha do Microsoft Excel®, elaborada especificamente para este fim, estes foram analisados por meio do software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 20.0, utilizando o teste de Kappa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil de BGN da Cloacal de *C. plancus* no Nordeste do Brasil

Das 87 aves da espécie *C. plancus* (Miller, 1777), coletadas pelo IBAMA-BA, cerca de 71.3% (n=62) apresentaram resultado positivo para o crescimento bacteriano em meios de cultura suplementados com antimicrobianos o que resultou em 104 microrganismos isolados. Destes, cerca de 71,2% (n=74) das cepas foram recuperadas em meio de cultivo com pressão seletiva de colistina (3,5 µg/mL), 19,2% (n=20) em meios com ceftriaxona (8 µg/mL) e, por fim, 9.6% (n=10) em meios com imipenem (1 µg/mL). Estes dados são importantes, pois indicam a presença de bactérias que desenvolveram mecanismos de resistência à polimixina B, um antimicrobiano seletivo para bactérias Gram-negativas (LIU et al., 2016).

Na identificação por MALDI-TOF, foi verificada uma alta diversidade microbiana de BGN nas amostras cloacais de *C. plancus*. Os 104 microrganismos pertenciam a 12 gêneros bacterianos, sendo eles: *Escherichia coli* 37,5% (n=39); *Proteus* spp. (15,4%, n=16), *Klebsiella* spp. (13,5%, n=14), *Enterobacter* spp. (4,8%, n=5), *Hafnia* spp. (4,8%, n=5), *Providencia* spp. (4,8%, n=5), *Serratia* spp. (3,8%, n=4), *Citrobacter* spp. (2,9%, n=3), *Morganella* spp. (2,8%, n=3), *Pseudomonas* spp. (2,8%, n=3), *Pantoea* spp. (0,95%, n=1) e *Acinetobacter* sp. (0,95%, n=1). Ademais, é importante destacar que também foram identificados 3,7% (n=4) fungos leveduriformes do gênero *Candida*.

As cepas de *E. coli* apresentaram scores no MALDI-TOF que variaram entre 2.100 e 2.558. A presença expressiva de *E. coli* nas amostras coletadas é esperada. Segundo Silva et al. (2020), esta bactéria é frequentemente isolada do trato intestinal de aves de vida livre.

Almeida et al (2005), ressaltam a necessidade de estudos dessa espécie bacteriana devido à capacidade desse microrganismo se tornar agente etiológico de infecções em aves. Dessa forma, os experimentos foram direcionados as cepas de *E. coli* para entendimento das características fenotípicas e genéticas desses isolados, além da investigação do papel do carcará na disseminação da RAM.

3.2 Pesquisa Fenotípica de Resistência das Cepas de *E. coli* aos Antimicrobianos

Os resultados revelaram que 33,3% (n=13) das cepas de *E. coli* foram resistentes a pelo menos um dos 14 antimicrobianos utilizados nos ensaios. A maior taxa de resistência se deu para os antimicrobianos: gentamicina e ceftriaxona, cefalosporina de 3ª geração, dos quais 13,97% dos isolados apresentaram resistência (Tabela III).

Foi observado que dentre todos os antimicrobianos, os carbapenéns, meropenem e ertapenem, foram os que demonstraram maior eficácia frente aos microrganismos (100%), seguido pela cefalosporina de 2ª geração cefoxitina e aminoglicosídeo, amicacina, ambos com 97,67%.

Tabela III – Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *E. coli* isoladas da cloaca de *C. plancus*

Antimicrobianos	Resistente %	Intermediário %	Sensível %
Amoxicilina/Ácido clavulânico	0	6,98	93,02
Aztreonam	11,63	2,32	86,05
Ceftriaxona	13,95	2,33	83,72
Ceftazidima	2,33	2,33	95,35
Cefepime	11,63	0	88,37
Cefoxitina	2,33	0	97,67
Imipenem	0	6,98	93,02
Ertapenem	0	0	100
Meropenem	0	0	100
Ciprofloxacino	4,65	0	95,35
Amicacina	0	2,33	97,67
Gentamicina	13,95	0	86,05
Nitrofurantoína	0	2,33	96,68
Tetraciclina	11,63	0	88,37

A maioria dos estudos que realizam o isolamento de *E. coli* a partir do trato intestinal de aves de vida livre ou criadas em cativeiro relatam que frequentemente estas cepas são

resistentes a pelo menos mais de um antimicrobiano, com porcentagem de cepas resistentes semelhantes à encontrada no presente estudo (AHMED *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021). Dados indicam que, este fenômeno pode estar relacionado ao uso prolongado e indiscriminado de antimicrobianos com intuito de melhorar práticas agropecuárias, como por exemplo, a criação de animais de abate (FERREIRA, KNOLB, 2000).

Além disso, a resistência à ciprofloxacina, uma fluorquinolona, está intimamente relacionada a mutações cromossômicas ou alterações na permeabilidade da droga à parede celular. O aumento da resistência a este antimicrobiano frente a *E. coli* vem sendo relatado e demonstram ser alarmante, uma vez que este é o fármaco de escolha para o tratamento de infecções do trato urinário, intestinal e respiratório (LAMBRECHT *et al.*, 2019; CORDEIRO-MOURA *et al.*, 2022). No presente estudo, 5% (2/39) apresentaram resistência a esse antimicrobiano.

O perfil de resistência às cefalosporinas de 2ª geração, como a cefoxitina (2,33%), e de 3ª geração, como a ceftriaxona (13,95%), presentes neste estudo, são similares aos descritos por Serafim (2013), sendo relativamente baixos. Apesar de outros trabalhos demonstrarem um aumento considerável na resistência às cefalosporinas de 3ª geração, aos aminoglicosídeos e a quinolonas, especialmente em espécies de *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (SILVA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021), reforçando a importância dos estudos de vigilância epidemiológica nessas áreas e espécies.

No presente estudo, observou-se que todas as amostras de *E. coli* foram sensíveis ao ertapenem e meropenem, havendo apenas resistência intermediária ao imipenem (6,98%). Essa diferença de resistência dentro de uma mesma classe de antimicrobianos, pode ser explicada por alterações na membrana ou hiperexpressão de bombas de efluxo em diferentes cepas do microrganismo. Além disso, a incidência de cepas apresentando resistência ou susceptibilidade reduzida à ceftazidina, sugerem a produção de ESBL nas *E. coli* analisadas (CURY *et al.*, 2020). Devido à importância clínica de cepas bacterianas produtoras de ESBL, que estão relacionadas a resistência e dificuldade de tratamento de pacientes hospitalizados, a partir do teste de disco-aproximação e da análise do resultado de antibiograma foram detectadas fenotipicamente 15,4% (6/39) cepas ESBL (Tabela IV) revelando, assim, a relevância da realização de pesquisas nessa temática (WHO, 2017; COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2021).

Tabela IV – Perfil de sensibilidade das amostras de *E. coli* positivas para produção de ESBL (n=6) pela técnica de disco aproximação.

Código Animal	Amostra	Perfil de Susceptibilidade		
		Resistente	Intermediário	Sensível
U58436	59	GEN; CRO; CPM; CIP	ATM	AMI; TET; CFO; MER; AMC; IPM; NIT; CAZ; ETP
U58459	70	GEN; ATM; CRO; CPM	CAZ	AMI; TET; CFO; MER; AMC; CIP; IPM; NIT; ETP
U58785	60	GEN; ATM; CRO; CPM; CAZ	AMC	AMI; TET; CFO; MER; CIP; IPM; NIT; ETP
U58760	65	GEN; ATM; CRO	–	AMI; TET; CFO; MER; AMC; CPM; CIP; IPM; NIT; CAZ; ETP
U58794	123	GEN; ATM; CRO; CPM	AMC	AMI; TET; CFO; MER; CIP; IPM; NIT; CAZ; ETP
	124	GEN; ATM; CRO; CPM	AMC	AMI; TET; CFO; MER; CIP; IPM; NIT; CAZ; ETP

AMC: Amoxicilina/ácido clavulânico; ATM: Aztreonam; NIT: Nitrofurantoína; CRO: Ceftriaxona; TET: Tetraciclina; IPM: Imipenem; CIP: Ciprofloxacino; MER: Meropenem; AMI: Amicacina; ETP: Ertapenem; GEN: Gentamicina; CAZ: Ceftazidima; CPM: Cefepime; CFO: Cefoxitina.

A diferença de eficácia entre a ceftriaxona e a ceftazidima, em microrganismos diferentes, pode estar relacionada com os diferentes tipos de enzimas classificadas como ESBL produzidas pelas bactérias que apresentam diferentes substratos preferenciais (CORDEIRO-MOURA et al., 2022).

Embora existam poucos estudos que relacionem *E. coli* produtoras de ESBL oriundas de amostras de *C. plancus* (SILVA et al., 2020), os valores encontrados (13,9%, n=6) corroboram com um aumento da resistência a antimicrobianos da classe dos betalactâmicos com o passar dos anos (CORDEIRO-MOURA et al., 2022). No estudo de Winokur et al. (2001) a porcentagem de cepas de *E. coli* produtoras de ESBL variou entre 4,2-8,5 em 12.876 cepas, obtidas entre os anos de 1997 a 1999. Posteriormente, em isolados coletados no ano de 2018, Silva et al. (2020) detectaram uma incidência de 29.6% enterobactérias ESBL isoladas da orofaringe das aves de rapina *Rupornis magnirostris* e *C. plancus*. Em

contrapartida, Silva et al. (2021) a partir da análise do perfil fenotípico e genético de 43 cepas de *E. coli* isoladas de aves Psittaciformes, não observaram o perfil ESBL em nenhum dos isolados, porém, detectou a presença do gene *bla_{KPC}* em 13 cepas obtidos de sete aves diferentes. Assim como foi encontrado no presente estudo, no qual 11,7% das cepas foram resistentes a ciprofloxacina.

Destaca-se, ainda, a alta sensibilidade a nitrofurantoina (96,68%) observada no presente estudo. Esses valores corroboram com o encontrado por Zurfluh (2019), que encontrou para este mesmo fármaco uma sensibilidade de 94,74% em amostras provenientes de swabs com amostras cloacais de pássaros. Uma vez que, este fármaco é um dos principais utilizados no tratamento empírico de Infecções do Trato Urinário (ITUs) e apresenta segurança durante a gravidez (LOPES; TAVARES, 2005).

Curiosamente, foi observado um perfil de resistência diferente para algumas cepas de *E. coli* oriundas da mesma ave (Tabela V), semelhante aos resultados encontrados em outros estudos com aves, que observaram a presença de populações bacterianas da mesma espécie com perfil fenotípico diferentes na mesma ave (SILVA et al., 2020, SIVLA et al., 2021). Diante disso, é possível que existam populações bacterianas que estejam envolvidas com o mecanismo de microbiota transitória nesses microrganismos, contribuindo de forma incisiva para a disseminação da RAM dentro do eixo: ambiente, animal e humano.

Tabela V - Perfil de susceptibilidade de cepas de *E. coli* provenientes de uma mesma ave de origem.

Código animal	Amostra	ESBL	Perfil de Susceptibilidade		
			Resistente	Intermediário	Sensível
U58785	26	(-)	TET	-	AMC; ATM; NIT; CRO; IPM; CIP; MER; AMI; ETP; GEN; CAZ; CPM; CFO
	60	(+)	GEN; ATM; CRO; CPM; CAZ	AMC	AMI; TET; CFO; MER; CIP; IPM; NIT; ETP
U58459	41	(-)	-	-	AMC; ATM; NIT; CRO; TET; IPM; CIP; MER; AMI; ETP; GEN; CAZ; CPM; CFO
	70	(+)	GEN; ATM; CRO; CPM	CAZ	ETP; NIT; IPM; CIP; AMC; MER; CFO; TET; AMI

AMC: Amoxicilina/ácido clavulânico; ATM: Aztreonam; NIT: Nitrofurantoína; CRO: Ceftriaxona; TET: Tetraciclina; IPM: Imipenem; CIP: Ciprofloxacino; MER: Meropenem; AMI: Amicacina; ETP: Ertapenem; GEN: Gentamicina; CAZ: Ceftazidima; CPM: Cefepime; CFO: Cefoxitina. ESBL: Betalactamase de espectro estendido. (-): Negativo. (+): positivo.

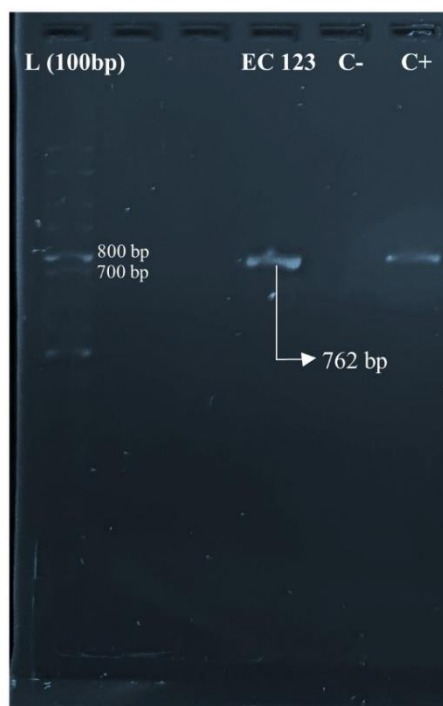
3.3 Pesquisa dos Genes de Betalactamases e *mcr-1*

Entre os isolados analisados, 28,2% (11/39) das cepas de *E. coli* foram portadoras de genes de resistência aos antimicrobianos. Foram estes os genes de resistência encontrados: *bla*_{CTX-M-1/2} (n=7), *bla*_{OXA-1} (n=3), *bla*_{KPC} (n=1) e *bla*_{GES} (n=1).

A cepa *E. coli* 123 apresentou o *bla*_{KPC} (Figura 1), relacionado à resistência aos carbapenêmicos mediada pela enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), uma enzima considerada uma das principais responsáveis por causar infecções graves e aumento dos índices de mortalidade em quadros clínicos de infecções bacterianas (BUSH, JACOB, 2010; SARTORI et al., 2018). Adicionalmente, foi observada resistência à ceftriaxona, cefepime e ao aztreonam e susceptibilidade aos carbapenêmicos imipenem, meropenem e ertapenem. Por se tratar de um gene plasmidial, a transmissibilidade é aumentada consideravelmente entre microrganismos da mesma espécie e até entre outras enterobactérias, tornando os isolados bacterianos que o adquirem como MDR, resultando em limitações nas

opções de tratamento de infecções graves (COSTA-JÚNIOR et al., 2021; COSTA-JÚNIOR et al., 2022).

Figura I. Eletroforese do produto da PCR do gene *bla_{KPC}* da cepa *E. coli* 123.



L: marcador de peso molecular; EC: *Escherichia coli*; C-: controle negativo (água ultrapura); C: KP13.

Um estudo anterior demonstrou que houve a presença deste mesmo gene em aves psitacíformes resgatadas do tráfico de animais na Paraíba, Brasil (SILVA et al., 2021), relatando a transmissibilidade entre espécies, a partir da análise de ERIC-PCR e observação da presença de clones entre as cepas de *E. coli* portadoras do gene *bla_{KPC}*, que pode ser indicativo de contaminação humana do bioma. No presente estudo, foi detectada a presença do gene *bla_{KPC}* na cepa *E. coli* 123. Porém, essa não apresentou resistência aos carbapênems. Os resultados demonstram que apesar de carregar este gene, a cepa possivelmente não o expressa fortemente. Resultados semelhantes foram reportados em isolados clínicos de *K. pneumoniae* no Brasil por Vivas et al. (2020), no estado de Sergipe, e Cabral et al. (2012), no estado de Pernambuco. Em outro trabalho conduzido por Cury et al. (2020) os autores reportaram o primeiro relato da presença do gene *bla_{KPC}* em cepas de *E. coli* susceptíveis a imipenem e ertapenem de isolados clínicos, no Brasil. No presente estudo, os dados revelam o primeiro relato do gene *bla_{KPC}* em cepas de *E. coli* de origem animal, apresentando susceptibilidade incomum aos carbapênems. Dessa forma, é possível relacionar uma interferência de cepas

clínicas no bioma, a partir das análises fenóticas e genéticas dessas bactérias ao longo do tempo, isoladas de ambas as origens: humana e animal.

Em relação ao gene *bla_{GES}*, este foi detectado em apenas uma cepa (*E. coli* 43). Esta apresentou resistência às cefalosporinas e tetraciclina. Assim como o *bla_{KPC}* é um dos mais disseminados genes plasmidiais entre enterobactérias, logo, de grande importância clínica (CABRAL et al., 2012, VIVAS et al., 2020). A família de genes *bla_{GES}* ganhou notoriedade por conferirem resistência aos carbapenêmicos em isolados de *P. aeruginosa* (POIREL et al., 2011; BEBRONE et al., 2013).

O gene *bla_{CTX-M-1/2}* foi o mais prevalente dentre as cepas de *E. coli* que possuíam genes de resistência aos betalactâmicos (63,3%, n=7). Trata-se de um gene plasmidial anteriormente relatado em amostras clínicas de humanos e animais, desde sua primeira descrição em isolados de Munique, Alemanha (BUSH; JACOBY, 2010; SARTORI, 2019). Neste estudo, as cepas que carregavam *bla_{CTX-M-1/2}* apresentaram resistência às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração e monobactâmicos, como *E. coli* 59, 65, 66, 70 e 124, e no caso da cepa *E. coli* 60, resistente também à amoxicilina/ácido clavulânico. Além disso, o gene foi detectado na cepa *E. coli* 41, porém, apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. É importante relatar que este gene foi anteriormente associado a surtos de colibacilose aviária no sul do Brasil (BARBIERI et al., 2015).

Os genes *bla_{OXA}* são responsáveis por codificar enzimas de resistências denominadas de oxacilinases, induzindo quadros de resistência à betalactâmicos (BUSH; JACOBY, 2010; EVANS; AMYES, 2014). Apesar de apresentar espectro fenotípico mais restrito, como cefalosporinas e penicilinas de espectro restrito, nos últimos anos vem sendo avaliado um aumento da sua atividade frente às cefalosporinas de amplo espectro e o imipenem (EVANS; AMYES, 2014). A cepa *E. coli* 66 possui um mecanismo de co-resistência codificadas pelos genes *bla_{OXA-1}* e *bla_{CTX-M-1/2}*, o que torna este isolado em particular, o maior portador de genes de resistência entre amostras de *E. coli* isoladas do presente estudo (Tabela VI).

Tabela VI. Origem e perfil de susceptibilidade das cepas de *E. coli* portadoras de genes de betalactamases isoladas da cloaca de *C. plancus*.

ID da cepa	Ave de origem	ATB suplementado	Resistência antimicrobiana	Genes betalactamases
<i>E. coli</i> 31	U58764	Colistina	NR*	<i>bla</i> _{OXA-1}
<i>E. coli</i> 41	U58459	Colistina	NR*	<i>bla</i> _{CTX-M-1/2}
<i>E. coli</i> 43	U58456	Colistina	TET, CRO (SSD)	<i>bla</i> _{GES}
<i>E. coli</i> 47	U58354	Colistina	NR*	<i>bla</i> _{OXA-1}
<i>E. coli</i> 59	U58436	Ceftriaxona	GEN; CRO; CPM; CIP, ATM (SSD)	<i>bla</i> _{CTX-M-1/2}
<i>E. coli</i> 60	U58760	Ceftriaxona	GEN; ATM; CRO; CPM; CAZ – AMC (SSD)	<i>bla</i> _{CTX-M-1/2}
<i>E. coli</i> 65	U58760	Ceftriaxona	GEN; ATM; CRO	<i>bla</i> _{CTX-M-1/2}
<i>E. coli</i> 66	U58459	Ceftriaxona	GEN; ATM; CRO	<i>bla</i> _{CTX-M-1/2} ; <i>bla</i> _{OXA-1}
<i>E. coli</i> 70	U58459	Ceftriaxona	GEN; ATM; CRO; CPM	<i>bla</i> _{CTX-M-1/2}
<i>E. coli</i> 123	U58794	Ceftriaxona	GEN; ATM; CRO; CPM	<i>bla</i> _{KPC}
<i>E. coli</i> 124	U58794	Ceftriaxona	GEN; ATM; CRO; CPM	<i>bla</i> _{CTX-M-1/2}

ATB: antimicrobiano; ATM: Aztreonam; CRO: Ceftriaxona; TET: Tetraciclina; CIP: Ciprofloxacino; MER: Meropenem; AMI: Amicacina; ETP: Ertapenem; GEN: Gentamicina; CPM: Cefepime; AMC: Amoxicilina/ácido clavulânico; CAZ: Ceftazidima; ID: Identificação; NR*: Não Relatado; SSD: Sensível Dose Dependente.

Não foram identificadas cepas portadoras do gene *mcr-1*. A triagem utilizando colistina (3,5 µg/mL) não garante a resistência a esse antimicrobiano, pois esse método apresenta baixa especificidade. Além disso, existem outros mecanismos de resistência às polimixinas que não estão relacionados a presença do gene *mcr* (LIU et al., 2016; COSTA-JÚNIOR et al., 2020). Similarmente, Silva et al. (2021) não detectaram a presença desse gene em cepas de *E. coli* que apresentaram resistência à polimixina B, por método de triagem utilizando meio McConkey suplementado, em amostras de aves Psittaciformes resgatadas do estado da Paraíba. Similarmente, estudo realizado na França em 2019, detectou 12 cepas de enterobactérias resistentes a polimixina B em 136 BGN isolados de fezes de pombos urbanos, pelo método de triagem com meio de cultura suplementando, porém, não observou a presença do gene *mcr-1* em nenhum dos isolados (NGAIGANAM et al., 2019).

3.4 Caracterização da Produção de Biofilme

Entre os isolados analisados, 29 (74,3%) foram classificados como fracamente

aderentes pelo método de coloração com CV e 36 (92,3%) foram classificados como produtores de biofilme pelo método de crescimento em ágar vermelho-congo. Resultados semelhantes foram encontrados por Rodrigues et al. (2019) que analisaram a capacidade de produção de biofilme em 238 isolados de aves e detectaram 55,8% (133/238) como produtores de biofilme pelo método CV.

As análises estatísticas mostraram um índice de concordância de 76,9% entre os métodos, com valor coeficiente Kappa de 0,22 (DP = 0,16), demonstrando ineficiência no método de vermelho-congo para diferenciação de cepas produtoras de biofilme em cepas de *E. coli* (valor de $p = 0,09$) (Tabela VII). Similarmente, o estudo de Pramodhini et al. (2012) demonstrou uma concordância de 84% entre os métodos para a detecção de bacilos Gram-negativos produtores de biofilme em amostras de urocultura, dos quais 70% dos isolados foram identificados com *E. coli*.

Tabela VII. Relação entre os resultados de produção de biofilme das metodologias utilizadas. Considerando o método de Cristal violeta como padrão-ouro.

		Vermelho-Congo	
		Positivo	Negativo
Cristal Violeta	Produtor	28	1
	Não produtor	8	2
	Total	36	3

Dentre as cepas portadoras de genes de betalactamases 81,8% (9/11) foram consideradas como produtor, destacando a prevalência preocupante de *E. coli* portadoras de genes de resistência e capazes de produzir biofilme. Similarmente o estudo de Katangole et al. (2020) analisou a capacidade de produção de biofilme em 156 isolados de *E. coli* MDR causadores de infecções urinárias em humanos e observou que 64% (100/156) dos isolados foram considerados como produtores de biofilme.

3.5 Genotipagem

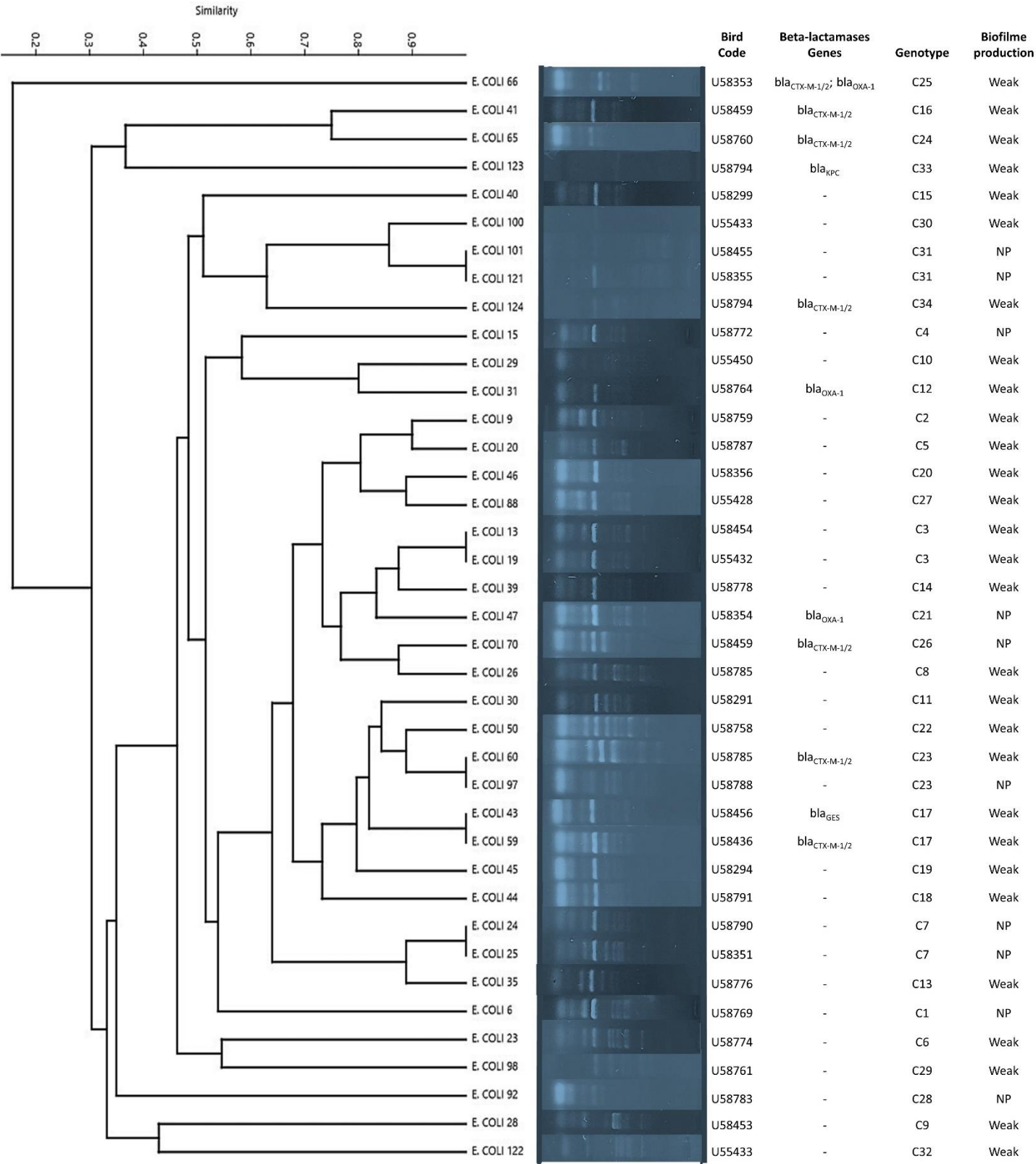
Para verificar o índice de clonalidade entre os isolados de *E. coli* foi utilizada a técnica de ERIC-PCR (Figura II), técnica molecular que possibilita averiguação da variabilidade clonal a partir de comparações das sequências repetitivas altamente conservadas nas regiões intergênicas do genoma bacteriano de cepas homólogas (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; SIMONI, 2013). Assim, foram observados 34 perfis clonais, dos quais os genótipos C3, C7, C17, C23 e C31, estavam presentes em dois isolados, cada. Por meio destes achados se tornou possível afirmar que existem cinco pares de clones bacterianos com 100% de similaridade. Isto permite afirmar uma transmissibilidade preocupante e alarmante de clones bacterianos entre diferentes aves no nordeste do Brasil. Os dados são preocupantes e servem de alerta que essa transmissibilidade pode estar ocorrendo em outras regiões do País.

Nos últimos anos, o papel das aves urbanas na disseminação da RAM está sendo alvo de investigação em todo o mundo (NGAIGANAM et al., 2019; SILVA et al., 2021; FREIRE et al., 2022). Estudo conduzido em Portugal, analisou a microbiota retal de 100 pombos urbanos (*Columbia livia*) e detectou nove (9%) cepas de *E. coli* produtoras de ESBL. Este, demonstrou a disseminação de sete genótipos diferentes portadores de genes de betalactamases entre as aves dessa espécie, pelo método de *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST). Similarmente, Ngaiganam et al. (2019) analisaram a presença de BGN-MDR em 136 amostras de fezes de aves urbanas de parques localizados em Marseille, França, e detectaram cinco (3.7%) cepas de *E. coli* produtoras de ESBL. Os resultados da genotipagem das cepas de *E. coli* ESBL, por MLST, revelaram quatro STs comuns entre amostras de humanos nas cepas isoladas das fezes dessas aves.

Assim, a disseminação de clones entre aves sugere uma possível transmissão para humanos pelo fato dessas aves estarem presentes nos centros urbanos, reforçando a ação antropológica na disseminação de microrganismos e revelando um emergente problema de saúde pública (NGAIGANAM et al., 2019; SILVA et al., 2021).

No presente estudo, houve divergência em relação a produção de biofilme pelo método de cristal violeta apenas no perfil clonal C23, do qual fazem parte as cepas *E. coli* 60 e *E. coli* 97. Além disso, os genótipos C3 e C17 foram considerados como fracamente produtoras de biofilme, sendo possível evidenciar a disseminação de microrganismos produtores de biofilme entre aves diferentes. A expressão do biofilme está relacionada a regiões do *Quorum Sensing* e clones bacterianos podem diferir em relação à expressão (ALAV, SUTTON, RAHMAN, 2018).

Figura II. Genotipagem das amostras de *E. coli* isoladas da cloaca de *C. Plancus*



NP: Não Produtor

4 CONCLUSÕES

O presente trabalho revelou diversidade bacteriana na microbiota intestinal da espécie *C. plancus*, destacando a presença majoritária de cepas de *E. coli* nas amostras. Além disso, um percentual preocupante das cepas de *E. coli* foram resistentes aos antimicrobianos. A incidência de cepas produtoras de ESBL demonstram o potencial dessas aves na disseminação de microrganismos resistentes e a interferência humana no bioma. Na pesquisa genotípica foi evidenciado uma prevalência maior do gene *bla*_{CTX-M-1/2}, no qual esteve presente principalmente nas cepas produtoras de ESBL. O surgimento do gene *bla*_{KPC} em um isolado susceptível aos carbapenêns, fenômeno visto anteriormente apenas em amostras de *E. coli* isoladas de uroculturas de humanos, é outro fator que caracteriza a íntima relação de transferência de microrganismos resistentes entre humanos e animais e intensifica a necessidade dos estudos *One Health* como metodologia para controle da RAM.

A tipagem molecular por ERIC-PCR demonstrou a presença de cinco pares de clones bacterianos isolados a partir de diferentes aves, o que reforça a ideia de uma contaminação e alta transmissibilidade entre esses animais. Entre os microrganismos isolados desses animais foram verificadas cepas capazes de produzir biofilme. A disseminação de microrganismos resistentes e produtores de biofilme são fatores associadas à dificuldade de tratamento de infecções. Os achados presentes neste trabalho fundamentam a relevância e necessidade de monitoramento desta espécie de ave, já que o isolamento de bactérias Gram-negativas que carregam e/ou expressam genes de resistência e capazes de produzirem biofilme podem afetar tantos estes animais, como os humanos, tornando-se um problema de saúde pública global.

5 REFERÊNCIAS

- Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, et al (2007) Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl Environ Microbiol* 73:6686–6690. <https://doi.org/10.1128/AEM.01054-07>
- Alav I, Sutton JM, Rahman KM (2018) Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother* 73:2003–2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>
- Baldotto SB, Somma AT, Lange RR, et al (2021) The crested caracara (*Caracara plancus*) eye: Morphologic observations and results of selected diagnostic tests. *Vet Ophthalmol* 24:533–542. <https://doi.org/10.1111/vop.12939>
- Barbieri NL, Oliveira AL de, Tejkowski TM, et al (2015) Molecular Characterization and Clonal Relationships Among *Escherichia coli* Strains Isolated from Broiler Chickens with Colisepticemia. *Foodborne Pathogens and Disease* 12:74–83. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014>
- Bebrone C, Bogaerts P, Delbrück H, et al (2013) GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues.

- Antimicrob Agents Chemother 57:396–401. <https://doi.org/10.1128/AAC.01784-12>
- Bush K, Jacoby GA (2010) Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 54:969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Cabral AB, Melo R de C de A, Maciel MAV, Lopes ACS (2012) Multidrug resistance genes, including *blaKPC* and *blaCTX-M-2*, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 45:572–578. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000500007>
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI document M02-A11. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), p. 69-156, 2019..1815
- Cordeiro-Moura JR, Kraychete GB, Longo LG de A, et al (2022) Description and comparative genomic analysis of a *mcr-1*-carrying *Escherichia coli* ST683/CC155 recovered from touristic coastal water in Northeastern Brazil. Infect Genet Evol 97:105196. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105196>
- Costa-Júnior SD da, Campos LA de A, Cavalcanti IDL, et al (2022) Dissemination and prevalence of polymyxin-resistant bacteria of clinical and environmental origin. RSD 11:e94111334996. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i13.34996>
- Costa-Junior SD, Campos LA de A, Campos LA de A, Ferro Cavalcanti IM (2018) Silver Nanoparticles as a Promising Therapeutic Strategy for Infections Caused by Resistant Bacteria in Cattle and Birds. APDV 4:1–5.
- Costa Júnior SD, da Silva WRC, da Silva AMCM, et al (2020) Synergistic Effect between Usnic Acid and Polymyxin B against Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2020:e9852145. <https://doi.org/10.1155/2020/9852145>
- Cury AP, Girardello R, Duarte AJ da S, Rossi F (2020) KPC-producing Enterobacterales with uncommon carbapenem susceptibility profile in Vitek 2 system. International Journal of Infectious Diseases 93:118–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.016>
- Duan H, Chai T, Liu J, et al (2009) Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. Environmental Research 109:511–517. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.02.014>
- Evans BA, Amyes SGB (2014) OXA β -Lactamases. Clin Microbiol Rev 27:241–263. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>
- Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT (1989) New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. Journal of Clinical Pathology 42:872–874. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>
- Freire S, Grilo T, Poirel L, Aires-de-Sousa M (2022) Urban Pigeons (*Columba livia*) as a Source of Broad-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Lisbon, Portugal. Antibiotics 11:1368. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101368>
- Fuga B, Sellera FP, Cerdeira L, et al (2022) WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. Microbiol Spectr 10:e01256-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01256-21>
- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A (1988) Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 10:867–878. <https://doi.org/10.1093/clinids/10.4.867>
- Katongole P, Nalubega F, Florence NC, et al (2020) Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical isolates in Uganda. BMC Infectious Diseases 20:453. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05186-1>
- Kürekci C, Osek J, Aydın M, et al (2019) Evaluation of bulk tank raw milk and raw chicken meat samples as source of ESBL producing *ESCHERICHIA COLI* in Turkey: Recent insights. Journal

- of Food Safety 39:e12605. <https://doi.org/10.1111/jfs.12605>
- Lambrecht E, Van Coillie E, Van Meervenne E, et al (2019) Commensal *E. coli* rapidly transfer antibiotic resistance genes to human intestinal microbiota in the Mucosal Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (M-SHIME). *Int J Food Microbiol* 311:108357. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108357>
- Lima HS, Mariz D, Da Silva Costa BM, et al (2022) Adaptation of Crested Caracaras (*Caracara plancus*) to Urban Environments: First Report of a Nest Made of Human-Made Materials. *Journal of Raptor Research* 56:. <https://doi.org/10.3356/JRR-22-07>
- Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, et al (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases* 16:161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Lomaestro BM, Tobin EH, Shang W, Gootz T (2006) The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* to upstate New York. *Clin Infect Dis* 43:e26-28. <https://doi.org/10.1086/505598>
- Lopes HV, Tavares W (2005) Diagnóstico das infecções do trato urinário. *Rev Assoc Med Bras* 51:306–308. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302005000600008>
- Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, et al (2007) Rapid Detection and Identification of Metallo- β -Lactamase-Encoding Genes by Multiplex Real-Time PCR Assay and Melt Curve Analysis. *J Clin Microbiol* 45:544–547. <https://doi.org/10.1128/JCM.01728-06>
- Ngaiganam EP, Pagnier I, Chaalal W, et al (2019) Investigation of urban birds as source of β -lactamase-producing Gram-negative bacteria in Marseille city, France. *Acta Vet Scand* 61:51. <https://doi.org/10.1186/s13028-019-0486-9>
- Nicoletti AG, Marcondes MFM, Martins WMBS, et al (2015) Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 59:5159–5164. <https://doi.org/10.1128/AAC.00158-15>
- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND (2002) Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:2153–2162. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002>
- Poirel L, Benouda A, Hays C, Nordmann P (2011) Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. *J Antimicrob Chemother* 66:2781–2783. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr384>
- Rocha IV, Dos Santos Silva N, das Neves Andrade CA, et al (2020) Diverse and emerging molecular mechanisms award polymyxins resistance to Enterobacteriaceae clinical isolates from a tertiary hospital of Recife, Brazil. *Infect Genet Evol* 85:104584. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104584>
- Rodrigues SV, Laviniki V, Borges KA, et al (2019) Biofilm Formation by Avian Pathogenic *Escherichia coli* is Not Related to In Vivo Pathogenicity. *Curr Microbiol* 76:194–199. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1608-8>
- Santos HF, Flôres ML, Lara VM, et al (2010) Microbiota cloacal aeróbia de cracídeos cativos no Rio Grande do Sul e sua susceptibilidade a antimicrobianos. *Pesq Vet Bras* 30:1077–1082. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010001200013>
- Sartori L, Sellera FP, Moura Q, et al (2019) Multidrug-resistant CTX-M-15-positive *Klebsiella pneumoniae* ST307 causing urinary tract infection in a dog in Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 19:96–97. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.003>
- Silva EF de A, Barros JFS de, Fraga KB, et al (2016) Cloacal enterobacteria isolated from captive roadside hawks (*Rupornis magnirostris*, GMELIN, 1788) and their antimicrobial susceptibility profile. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 53:207–213. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i2p207-213>
- Silva FA da, Medeiros SM de FR dos S, Costa-Junior SD da, et al (2020) Antimicrobial Resistance

- Profile and Biofilm Production of Microorganisms Isolated from Oropharynx of *Rupornis magnirostris* (Gmelin, 1788) and *Caracara plancus* (Miller, 1777). Veterinary Medicine International 2020:e8888618. <https://doi.org/10.1155/2020/8888618>
- Silva GG da C, Campana EH, Vasconcelos PC, et al (2021) Occurrence of KPC-Producing *Escherichia coli* in Psittaciformes Rescued from Trafficking in Paraíba, Brazil. IJERPH 18:95. <https://doi.org/10.3390/ijerph18010095>
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS 115:891–899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Vivas R, Dolabella SS, Barbosa AAT, Jain S (2020) Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. Rev Soc Bras Med Trop 53:. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0064-2020>
- von Wintersdorff CJH, Penders J, van Niekerk JM, et al (2016) Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. Frontiers in Microbiology 7:
- Weinstein MP (ed) (2019) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 29th edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania
- WHO (2017). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-EMP-IAU-2017.12>. Accessed 9 Nov 2022
- Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N (2001) Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clin Infect Dis 32 Suppl 2:S94-103. <https://doi.org/10.1086/320182>
- Zurfluh K, Albin S, Mattmann P, et al (2019) Antimicrobial resistant and extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in common wild bird species in Switzerland. Microbiologyopen 8:e845. <https://doi.org/10.1002/mbo3.845>

4.4 ARTIGO 4: *Escherichia coli*: um biomarcador de disseminação da resistência antimicrobiana (RAM) no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil

O manuscrito intitulado “***Escherichia coli*: um biomarcador de disseminação da resistência antimicrobiana (RAM) no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil**” está submetido na revista *Environmental Pollution* (1987).

***Escherichia coli* como biomarcador de disseminação da Resistência Antimicrobiana (RAM) no estado da Paraíba, Brasil**

Autores: Sérgio Dias Costa-Júnior^{1*}; Vinicius Pietta Perez^{1,2}; Almy de Sá Carvalho Filho³; Artur Cezar de Carvalho Fernandes⁴; Rayanna Barroso de Oliveira Alves⁵; Rosner Henrique Alves Rodrigues⁵; Hernande Pereira da Silva⁵; Celso José Bruno de Oliveira³; Eloiza Helena

Campana^{2,6}; Maria Betânia de Melo Oliveira⁷

Instituições: ¹Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58.051-900, João Pessoa, PB, Brasil; ²Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58.051-900, João Pessoa, PB, Brasil; ³Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA), Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58397-000, Areia, PB, Brasil; ⁴Departamento de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba (CCA-UFPB), 58397-000, Areia, PB, Brasil; ⁵Instituto de Redução de Riscos e Desastres de Pernambuco-IRRDP-PE/UFRPE, Centro de Geoprocessamento e Sensoriamento Remoto, Universidade Federal Rural de Pernambuco GEOSERE/UFRPE, 52171-900, Recife, PE, Brasil; ⁶Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58.051-900, João Pessoa, PB, Brasil; ⁷Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50670-901, Recife, PE, Brasil.

Resumo

Escherichia coli é um microrganismo de ampla distribuição em diferentes compartimentos. A ubiquidade na microbiota de animais e ambiente, possibilita aplicar o monitoramento desta espécie como um biomarcador na disseminação da Resistência Antimicrobiana (RAM). O objetivo desta pesquisa foi caracterizar isolados de *E. coli* e avaliar a dinâmica de disseminação desses isolados no estado da Paraíba, nordeste do Brasil. Para isso, foram investigados 11 isolados bacterianos provenientes de leite cru, oriundos de diferentes municípios do estado da Paraíba, e 26 isolados clínicos de origem hospitalar em dois hospitais do estado. Todos os isolados foram obtidos entre os meses de setembro de 2021 a maio de 2022. A identificação ao nível de espécie foi realizada por *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight* (MALDI-TOF-MS). Após esta triagem, as cepas foram submetidas ao teste de disco-difusão em ágar. Posteriormente foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de 26 genes de betalactamases e do gene de resistência à colistina mediada por plasmídeo (*mcr-1*). Adicionalmente foi utilizada a *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – PCR* (ERIC-PCR) para determinar o perfil clonal dos isolados. Por fim, foram aplicados e comparados os métodos de coloração com Cristal Violeta (CV) e crescimento em meio vermelho-congo para analisar a capacidade de produção de biofilme. Ao todo, foram isolados 84 microrganismos nas amostras de leite cru, dos quais 13,4% (n=11) pertencentes à espécie *E. coli*. O gene *bla_{CTX-M-1/2}* foi o mais prevalente em ambas as amostras de leite e clínicas: 18,2% (2/11) e 23,1% (6/26), respectivamente. Enquanto, *bla_{OXA-1}* foi detectado em uma (9,1%) amostra de leite e quatro (15,4%) clínicas. Os genes *bla_{GES}*, *bla_{NDM}* e *bla_{SHV}* foram detectados somente em amostras de origem humana, em 19,2% (5/26), 3,8% (1/26) e 3,8% (1/26), respectivamente. Este estudo corresponde ao primeiro reporte do *bla_{NDM}* no estado da Paraíba, nordeste do Brasil. Os dados

revelaram uma maior proporção de cepas produtora de biofilme entre os isolados clínicos (73,1%, n=19) quando comparadas as cepas de leite cru (45,4%, n=5). A partir da análise da ERIC-PCR foi observado a presença de 31 perfis clonais, com a disseminação de clones em amostras de leite de tanques diferentes e em diferentes pacientes no ambiente hospitalar. Esta pesquisa identificou determinantes de resistência nesses diferentes compartimentos no estado da Paraíba, os quais possivelmente estão relacionados a fatores ambientais que podem contribuir com a disseminação da RAM. A realização desta pesquisa foi baseada na perspectiva *One Health* no combate a RAM, e revelou a disseminação de cepas de *E. coli* produtoras de CTX-M em animais, alimentos e isolados clínicos humanos.

Palavras-chaves: CTX-M; Biofilme; Perfil Clonal; *One health*.

1. Introdução

Apesar de possuir como habitat natural o trato gastrointestinal de animais endotérmicos, como os humanos, a *Escherichia coli* pode ser encontrada amplamente dispersa no ambiente, principalmente em águas de mares e rios, além de alimentos de agricultura, devido ao despejo inadequado de esgoto (CORDEIRO-MOURA et al., 2022). A diversidade de fatores de virulência reconhecidos envolve a capacidade de modificar a superfície celular, liberar toxinas invasinas e realizar a translocação de proteínas efetoras por sistemas de secreção. Devido à alta eficiência das cepas de *E. coli* na regulação e aquisição de genes que codificam mecanismos de resistência aos antimicrobianos, principalmente sob pressão seletiva, são reportadas alta prevalência de resistência a betalactâmicos e polimixinas nessa espécie (CORDEIRO-MOURA et al., 2022; FUGA et al., 2022). Dessa forma, devido a sua ampla dispersão no ambiente, na saúde humana e animal e em alimentos, esses microrganismos são considerados como biomarcadores importantes para estudos de rastreamento da disseminação da Resistência Antimicrobiana (RAM) (PELEG et al., 2010; WHO, 2017; CORDEIRO-MOURA et al., 2022; FUGA et al., 2022).

Em bovinos, esses microrganismos estão associados a cerca de 15-20% dos casos de mastite infecciosa, podendo manifestar de uma condição leve até sepse fatal no animal (BOTREL et al., 2010). A presença de processos infecciosos pode acarretar na contaminação de produtos de origem animal, dessa forma, a *E. coli* é considerada como um dos principais contaminantes das amostras de leite, acarretando em altos prejuízos na criação de gado e indústria alimentícia (BOTREL et al., 2010; COSTA-JÚNIOR et al., 2018). O leite é um fluido secretado por fêmeas mamíferas visando atender as necessidades nutricionais de indivíduos neonatos. Porém, a coleta inadequada e o processamento desse fluido para o procedimento de distribuição expõem este aos microrganismos. O processo de pasteurização

foi implementado na indústria alimentícia como um método antimicrobiano, no entanto, ainda são relatados diversos casos de processos infecciosos em indivíduos após consumo de leite pasteurizado (BOTREL et al., 2010; COSTA-JÚNIOR et al., 2018).

Em humanos, é um importante patógeno oportunista sendo associada às Infecções do Trato Urinário (ITUs), infecções intra-abdominais, pulmonares, da pele, de tecidos moles, meningite neonatal e sepse, além de infecções intestinais, que incluem várias formas de diarreia e a síndrome hemolítica e urêmica (LAMBRECHT et al., 2019; CORDEIRO-MOURA et al., 2022). Além da alta prevalência desses microrganismos em infecções comunitárias e hospitalares, a disseminação de cepas resistentes pertencentes a essa espécie é considerada como um fator preocupante de emergência na saúde pública (CORDEIRO-MOURA et al., 2022; FUGA et al., 2022).

Entre os principais mecanismos de resistência em cepas de *E. coli*, associados a altas taxas de morbimortalidade nos pacientes, destaca-se a produção de enzimas betalactamases como as Betalactamases de Espectro Estendido (ESBL) e carbapenemases (TOOKE et al., 2019; OLIVEIRA SANTOS et al., 2022). Essas são consideradas uma grave ameaça à saúde humana e animal, uma vez que limitam o uso de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenéns. Com a emergência de cepas produtoras de carbapenemases, houve o retorno do uso das polimixinas na medicina humana e animal para o tratamento de infecções causadas por Bacilos Gram-Negativos Multidroga-resistentes (BGN-MDR). Entretanto, em decorrência do amplo uso das polimixinas como fator de crescimento de animais na agropecuária, houve a emergência de cepas resistentes às polimixinas carreando elementos genéticos móveis que codificam a enzima de resistência a colistina mediada por plasmídeo (MCR). O surgimento dessa enzima foi reconhecido como uma severa ameaça ao tratamento de infecções por cepas MDR (TOOKE et al., 2019; OLIVEIRA SANTOS et al., 2022; LIU et al., 2016; COSTA-JÚNIOR et al., 2021).

Entre as metodologias utilizadas para o rastreio de cepas MDR, destacam-se as ferramentas de genotipagem bacteriana. Essas possibilitam evidenciar as relações entre microrganismos de mesma espécie em determinada área geográfica durante um período determinado, a fim de contribuir para o controle da disseminação e surtos de bactérias resistentes (JACOMÉ et al., 2016; COSTA-JÚNIOR et al., 2021; FUGA et al., 2022). Além disso, são reportadas diversas espécies de microrganismos capazes de produzir biofilmes, em bactérias patogênicas de infecções hospitalares, infecções comunitárias, colonizadoras e

ambientais. Em cepas de *E. coli*, a capacidade de produção de biofilme é principalmente relacionada com microrganismos causadores de infecções do trato urinário, da próstata e isolados de cateteres venosos centrais (ALAV, SUTTON, RAHMAN, 2018; COSTA-JÚNIOR et al., 2018). Além disso, o período pandêmico iniciado em 2020 revelou um outro fator preocupante na disseminação da RAM, a coinfeção bacteriana e o risco que a ampla utilização de antibiótico em pacientes com a COVID-19 representa para a disseminação de cepas resistentes (GARCIA-VIDAL et al., 2021). Microrganismos como *E. coli*, que apresentam alta prevalência em infecções comunitárias e hospitalares são importantes ferramentas de estudos para avaliação da RAM em pacientes com COVID-19 (HUANG et al., 2020; FUGA et al., 2022). Garcia-vidal et al. (2021) descreveram, uma prevalência de 33,5% de infecções urinárias causadas por *E. coli* em pacientes internados devido à COVID-19 em um hospital de Barcelona, Espanha.

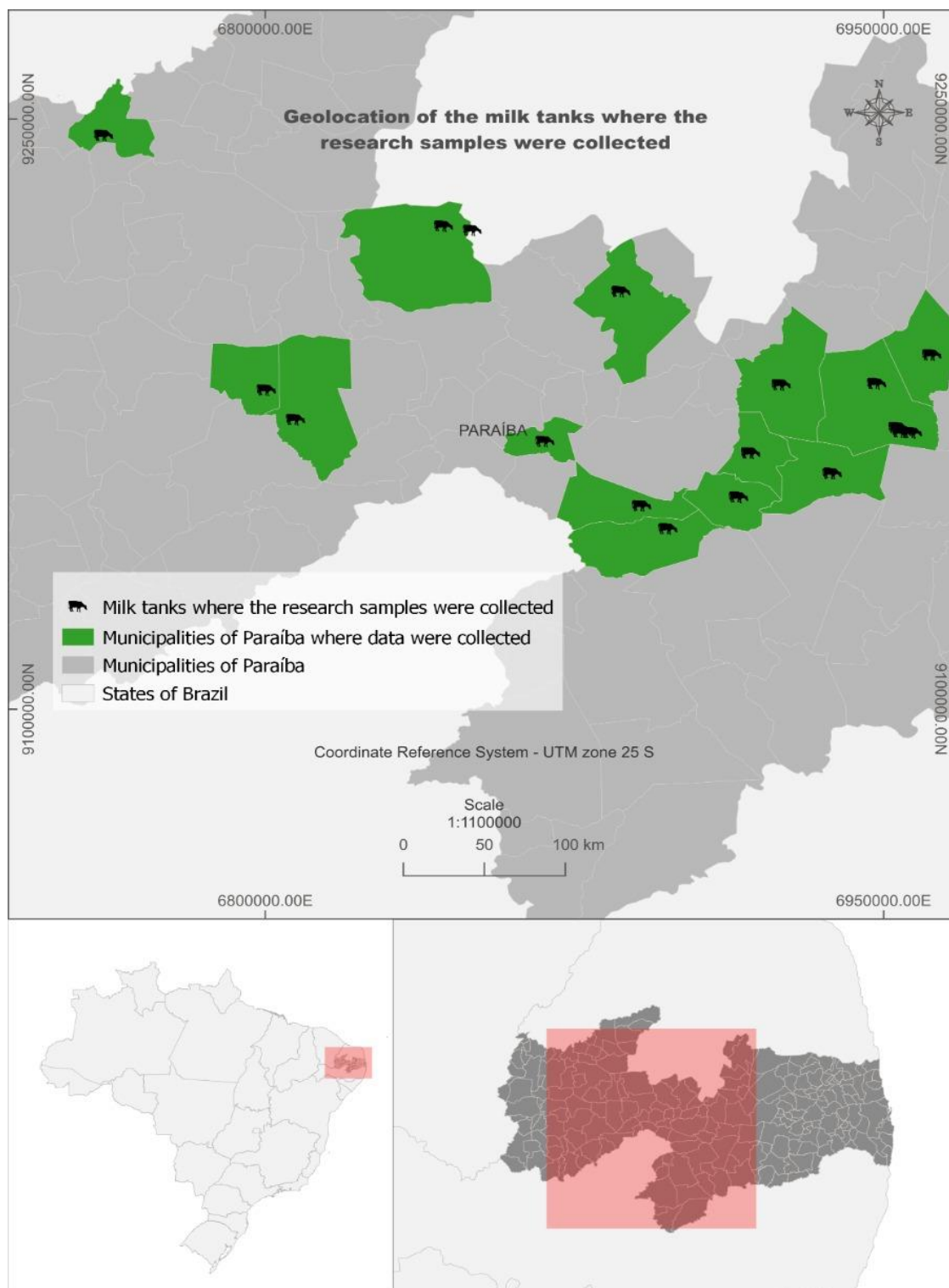
Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo caracterizar o perfil fenotípico e molecular de isolados de *E. coli* obtidos de diferentes fontes (ambientais e clínicos) no estado da Paraíba e avaliar seu potencial na disseminação da RAM no estado.

2. Materiais e Métodos

2.1 Obtenção de isolados de leite cru

Foram realizadas as coletas de 20 amostras em tanques de leite industrializados de 15 municípios do estado da Paraíba (Figura 1), no período de setembro a dezembro de 2021. Todas as amostras obtidas dos leites coletados foram inicialmente centrifugadas a 4000 RPM durante 10 minutos e 200 µL de cada amostra foram inoculados em placas de ágar MacConkey suplementados com os antimicrobianos: i) imipenem (1 µg/mL); ii) sulfato de colistina (3,5 µg/mL); iii) ceftriaxona (8 µg/mL) e, então, incubados em condições de aerobiose a 37 °C/*overnight*. Posteriormente, foram selecionadas colônias suspeitas a partir de suas características morfológicas e fermentação de lactose. Os isolados foram armazenados em *Tryptic Soy Broth* (TSB) adicionado de glicerol 15% e mantidos a temperatura de -80 °C.

Figura 1. Municípios do estado da Paraíba onde foram coletadas as amostras nos tanques de leite. Demonstrando por meio de georreferenciamento a localização dos tanques de leite cru.



2.2 Obtenção dos Isolados Clínicos

Vinte e seis isolados de *E. coli* foram obtidos de amostras por conveniência no período de fevereiro a maio de 2022 dos Laboratórios de Microbiologia de dois hospitais da cidade de João Pessoa no Estado da Paraíba, Brasil, e armazenados em meio TSB adicionado de glicerol 15% e mantidos a temperatura de -80 °C.

2.3.1 Identificação Microbiana

Os isolados tiveram a confirmação da identificação ao nível de espécie pelo método de espectrometria de massas, utilizando a técnica *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (MALDI-TOF-MS) de acordo com Silva et al. (2021).

2.3.2 Perfil de Susceptibilidade aos antimicrobianos

Para os isolados obtidos de tanques de leite foi utilizado a metodologia de Kirby e Bauer (1966) e *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST, 2022), testando os seguintes antimicrobianos: amicacina (30 µg); amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg); aztreonam (30 µg); cefepime (30 µg); cefoxitina (30 µg); ceftazidima (30 µg); ceftriaxona (30 µg); ciprofloxacino (5 µg); ertapenem (10 µg); gentamicina (10 µg); imipenem (10 µg); meropenem (10 µg); nitrofurantoína (300 µg) e tetraciclina (30 µg). Para os isolados clínicos as análises foram realizadas no sistema automatizado Vitek®2 e avaliados os antimicrobianos: ampicilina, amicacina, amoxicilina/ácido clavulânico; aztreonam; cefalexina, cefepime, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacino, ertapenem, gentamicina, imipenem, meropenem, norfloxacin e sulfametoxazol/trimetoprim e tigeciclina. As interpretações dos resultados foram realizadas seguindo as normas do BrCAST, 2022.

2.5 Extração de DNA

As bactérias foram reativadas a partir do semeio em placas contendo ágar MacConkey suplementos com antibióticos e incubadas por 24 a 48 horas em estufa a 37 °C. Posteriormente, uma colônia de cada isolado foi incubada em BHI durante 4h a 37 °C para posterior extração do DNA total. O DNA bacteriano foi extraído com o Kit *PureLink* Reagente (*Invitrogen*), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante e mantidos a -20 °C.

2.6 Pesquisa dos Genes de Resistência Bacteriana

2.6.1 Detecção de Genes de Resistência aos Betalactâmicos

A pesquisa dos determinantes de resistência foi realizada a partir do método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foi analisada a presença dos genes codificadores de betalactamses, como: i) cefalosporinases mediadas por plasmídeo (*bla*_{MOX}; *bla*_{CMY-1}; *bla*_{LAT}; *bla*_{CMY-2}; *bla*_{MIR}; *bla*_{ACT}; *bla*_{DHA}; *bla*_{FOX}; *bla*_{AAC}) (PÉREZ; HANSON, 2002); ii) oxacilinases não carbapenemases (*bla*_{OXA-1}; *bla*_{OXA-2}; *bla*_{OXA-10}; *bla*_{OXA-18}; *bla*_{OXA-45}); (iii) ESBLs (*bla*_{GES}; *bla*_{TEM}; *bla*_{SHV}; *bla*_{CTX-M-1/2}; *bla*_{CTX-M-8}; *bla*_{CTX-M-14}) (NICOLETTI et al, 2015); iv) metalo-betalactamases (*bla*_{IMP}; *bla*_{VIM}; *bla*_{SPM}; *bla*_{GIM}; *bla*_{NDM}) (MENDES et al., 2007; POIREL et al., 2011) e *bla*_{KPC} (LOMAESTRO et al., 2006). Para detecção de cada um dos referidos genes, cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 µL incluindo: 10ng de DNA genômico, 10pmol de cada primer, 5 µL de tampão de reação a 5x, 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 1,5 mM MgCl₂, 2,0 U Taq DNA polimerase e água ultrapura. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 0,5x. Esses produtos foram corados com o corante *Blue-Green* (Kasvi, Brasil), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados. Para cada reação foram utilizadas cepas caracterizadas geneticamente pelo Laboratório ALERTA da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e como controle negativo, uma alíquota de água DNase/RNase livre.

2.6.2 Detecção do Gene *mcr-1*

Nas reações de amplificação para o gene *mcr-1* foram utilizados os primers CLR5-F e CLR5-R, descritos por Liu et al (2016). Para detecção de cada um dos referidos genes, cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 µL para cada tubo, incluindo: 10ng de DNA genômico, 10pmol de cada primer, 5 µL de tampão de reação a 5x, 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 1,5 mM MgCl₂ e 2,0 U Taq DNA polimerase e água ultrapura. Durante a realização da PCR, foram incluídos como controle positivo a amostra de DNA da cepa *E. coli* C153 (ROCHA et al., 2020) e como controle negativo a amostra de DNA adicionando água. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 0,5x. Esses produtos foram corados por *Blue-Green* (Kasvi, Brasil), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados.

2.7 Tipagem Molecular

As reações ERIC-PCR foram preparadas com volume total de 25 µL por tubo; contendo: 100 ng de DNA genômico, 40 pmol de iniciadores (ERIC-1 [5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC G-3']), 5 µL de tampão de reação a 5x, 200 µM de trifosfato de desoxirribonucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase. Os parâmetros de amplificação usados na ERIC-PCR foram de acordo com Duan et al. (2009). Os produtos da PCR foram corados e submetidos à eletroforese 1,5% em gel de agarose; estes foram visualizados sob luz ultravioleta e foto-documentados para posterior análise de perfil clonal. Os padrões de amplificação foram comparados ao marcador de peso molecular para genotipagem dos isolados. Para análise filogenética detalhada, os padrões de *amplicons* gerados por ERIC-PCR foram utilizados para construção de uma matriz binária, utilizando como base os critérios de ausência e presença das bandas.

2.7 Produção de Biofilme

2.9.1 Crescimento em Ágar Vermelho-congo

A determinação qualitativa da capacidade de produção de biofilme pelos isolados foi realizada de acordo com o método de ágar Vermelho-congo, seguindo o protocolo descrito por Freeman, Falkiner, Keane (1989). Colônias que apresentaram coloração enegrecida, com consistência seca ou rugosa, foram consideradas como produtoras de biofilmes e as colônias de coloração vermelha, com consistência mucosa, foram consideradas como não produtoras de biofilme. *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle positivo para o método e *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 como controle negativo.

2.7.2 Coloração com Cristal-violeta

A determinação quantitativa da capacidade de produção de biofilme pelos isolados foi realizada de acordo com o método coloração com cristal violeta utilizando placa de 96 poços seguindo o protocolo por Stepanovic et al. (2007) e Silva et al. (2020). As cepas foram classificadas em quatro categorias baseado nos valores de DOs dos biofilmes bacterianos em comparação com valor da DOc (Densidade óptica do controle). Categorias: não produtor ($DO \leq DOc$), fracamente produtor ($DOc < DO \leq 2 \times DOc$), moderadamente produtor ($2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$) e fortemente produtor ($4 \times DOc < DO$).

2.10 Análises Estatísticas

Os dados foram tabulados utilizando planilha do *Microsoft Excel®*, elaborada especificamente para este fim e analisados por meio do software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 22.0, utilizando o teste de Qui-quadrado considerando 95% de confiabilidade.

3 Resultados e Discussão

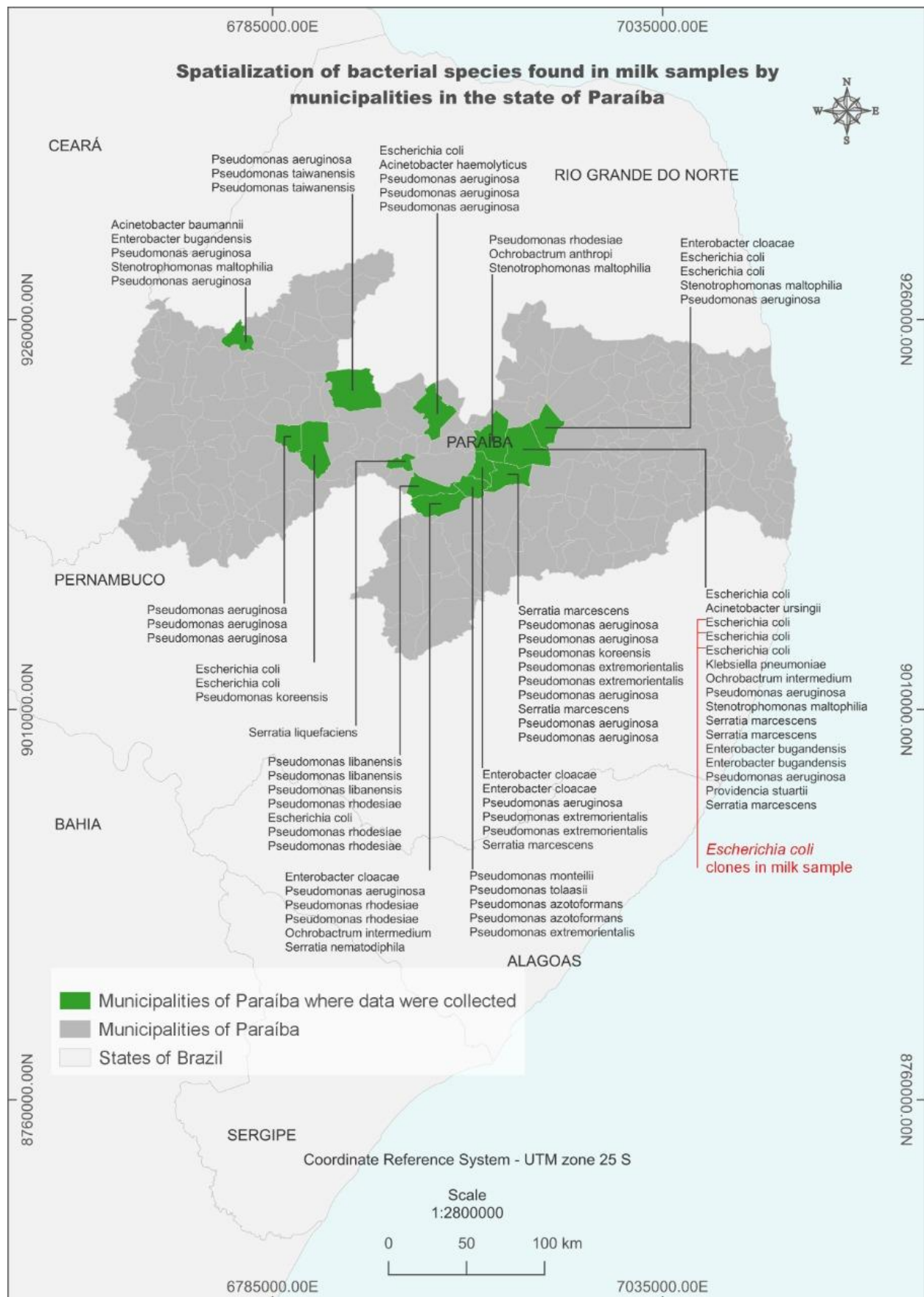
3.1 Rastreio e Perfil Fenotípico de *E. coli* nas Amostras de Leite Cru

Das 20 amostras de leite coletadas, 19 (95%) apresentaram crescimento bacteriano positivo no meio MacConkey. Após análise da capacidade de fermentação de glicose e morfologia das colônias neste meio, um total de 84 bacilos Gram-negativos foram isolados e submetidos a identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF. Entre os microrganismos isolados foram identificados nove gêneros indicando uma variedade de contaminantes nas amostras de leite bovino. Os microrganismos isolados pertenciam aos seguintes gêneros e espécies: *K. pneumoniae* (1,2%, n=1), *Providencia stuartii* (1,2%, n=1), *Serratia nematodiphila* (1,2%, n=1), *Serratia liquefaciens* (1,2%, n=1), *Acinetobacter* sp. (3,7%, n=3), *Ochrobactrum intermedium* (3,7%, n=3), *Stenotrophomonas maltophilia* (6.1%, n=5), *Serratia marcescens* (7,3%, n=6), *Enterobacter* sp. (11%, n=9), *E. coli* (13,4%, n=11) e *Pseudomonas* sp. (50%, n=41). Dos 84 bacilos Gram-negativos isolados, 38 (43,9%) foram isolados de meio sem suplementação com antibiótico, 15 (18.3%) em meio com ceftriaxona, 19 (23,2%) com imipenem e 12 (14,6%) com colistina.

A identificação das cepas de *E. coli* geraram scores no MALDI-TOF que variaram de 2.161 a 2.448. Foi identificado crescimento de *E. coli* em 35% (7/20) das amostras de leite em seis (40%) diferentes municípios (Figura 2). Similarmente, estudo realizado na Turquia, analisou a presença de *E. coli* em 62 amostras coletadas de tanques de leites, nos quais foram depositados os leites de 1252 fazendas da região. Verificou-se a presença de *E. coli* em 22.6% (14/62) das amostras de leite, sendo todas as cepas caracterizadas fenotipicamente como produtoras de ESBL (KÜREKCI et al., 2019). No presente estudo 36.4% (4/11) das cepas de *E. coli* foram caracterizadas como ESBL por meio da análise dos resultados do teste de disco-difusão (BOTREL et al., 2010; LIU et al., 2014; COSTA-JÚNIOR et al., 2018).

Na análise do perfil de susceptibilidade foi observado que 45,5% (5/11) apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. Ceftriaxona, ceftazidima e cefotaxima foram os que apresentaram menor atividade frente a esses microrganismos; dos quais 36,4% (4/11) foram resistentes a esses fármacos. Ademais, o meropenem foi o único fármaco que apresentou atividade frente todas as cepas analisadas. Somente um isolado foi resistente a ciprofloxacina, demonstrando eficácia frente a esses microrganismos. Resultados semelhantes foram encontrados por Kürekci et al. (2019) e Liu et al. (2021) nas cepas de *E. coli* isoladas de tanques de leite da Turquia e norte da China, respectivamente. Kürekci et al. (2019) descreveram 7,1% (4/62) das cepas como resistentes a ciprofloxacina e Liu et al. (2021) 1,5% (1/67). Dessa forma, destaca-se a eficácia desse fármaco frente as cepas dessa espécie em amostras isoladas de leite cru.

Figura 2. Diversidade microbiana nas amostras de tanques de leite cru dos municípios do



estado da Paraíba e distribuição das cepas de *E. coli* com emergência de clone bacteriano.

3.2 Caracterização Fenotípica das Cepas de *E. coli* em Amostras Clínicas

Foram coletadas 26 cepas de *E. coli* em amostras clínicas, das quais 3,8% (1/26) foram de swab retal, 3,8% (1/26) de bolsa escrotal e 92,4% (24/26) de urina. A confirmação da identificação das amostras pelo MALDI-TOF-MS geraram scores que variaram de 2.048 a 2.446. A alta incidência de cepas de *E. coli* nas amostras de urocultura está associada à eficiência desse microrganismo em causar ITUs em mulheres, devido a fatores de patogenicidade (CARVALHO et al., 2021; CORDEIRO-MOURA et al., 2022).

Dentre os antimicrobianos testados no presente estudo, os carbapenêns apresentaram maior atividade frente a esses isolados clínicos, dos quais somente 3,85% (1/26) foi resistente ao imipenem, meropenem e ertapenem (Tabela 1). No entanto, o ciprofloxacino, antibiótico da classe das fluorquinolonas, apresentou menor eficácia, revelando 53,8% (14/26) dos isolados resistentes. Esse fato pode estar associado à ampla utilização desse antibiótico no tratamento das ITUs, tornando as cepas de *E. coli* susceptíveis aos processos de adaptação e pressão seletiva exercido por esse (CORDEIRO-MOURA et al., 2022). Similarmente, estudos realizados a partir de isolados clínicos de *E. coli* de hospitais de Portugal e do Panamá, observaram alta taxa de resistência a ciprofloxacino, 94,7% (36/38) e 77% (23/30) dos isolados, respectivamente, destacando a importância do rastreio da resistência a esse antibiótico em cepas clínicas (CARVALHO et al., 2021; NÚÑEZ-SAMUDIO et al., 2021).

Em relação ao fenótipo de resistência ESBL, 23,1% (6/26) dos isolados foram resistentes às cefalosporinas de terceira e quarta geração, ceftazidima e cefepime, e ao monobactâmico aztreonam. Resultados semelhantes foram reportados por Núñez-Samudio et al. (2021) a partir da análise do perfil fenotípico de cepas de *E. coli* isoladas de amostras clínicas de pacientes de um hospital do Panamá no ano de 2019, das quais 43% (13) foram caracterizadas como ESBL por meio da análise do teste de disco-difusão. Além disso, das cepas analisadas no estudo de Núñez-Samudio et al. (2021), 67% (20/30) foram isoladas de urocultura. Cepas ESBL são consideradas uma severa ameaça à saúde humana e animal. Essas enzimas são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Além disso, podem ser transferidas entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes, sendo a detecção de cepas produtoras de ESBL associada diretamente a bactérias multirresistentes e altas taxas de mortalidade (MEYER, PICOLI, 2011; COSTA-JÚNIOR et al., 2021).

Tabela 1 – Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados clínicos de *E. coli*.

Antimicrobianos	Resistente n (%)	Intermediário n (%)	Sensível n (%)
Ampicilina	8 (30,7%)	-	18 (69,3%)
Amoxicilina/Ácido clavulânico	5 (19,2%)	-	21 (80,8%)
Aztreonam	6 (23,1%)	-	20 (76,9%)
Cefalexina	9 (34,6%)	9 (34,6%)	8 (30,7%)
Ceftriaxona	9 (34,6%)	-	17 (65,4%)
Ceftazidima	6 (23,1%)	-	20 (76,9%)
Cefepime	6 (23,1%)	-	20 (76,9%)
Cefoxitina	9 (34,6%)	-	17 (65,4%)
Imipenem	1 (3,85%)	-	25 (96,1%)
Ertapenem	1 (3,85%)	-	25 (96,1%)
Meropenem	1 (3,85%)	-	25 (96,1%)
Ciprofloxacino	14 (53,8%)	-	12 (46,2%)
Amicacina	2 (7,7%)	-	24 (92,3%)
Gentamicina	4 (15,4%)	-	22 (84,6%)
Norfloxacina	10 (38,5%)	-	16 (61,5%)
Sulfametoxazol/Trimetoprim	9 (34,6%)	-	17 (65,4%)
Tigeciclina	4 (15,4%)	-	22 (84,6%)

Dessa forma, é possível observar divergências no perfil de susceptibilidade a ciprofloxacino de isolados de *E. coli* de amostras de leite cru em relação aos isolados clínicos. Porém, foram observados valores semelhantes de distribuição de cepas ESBL entre os microrganismos de ambas as origens, caracterizando um perfil de resistência aos betalactâmicos semelhante entre esses microrganismos.

3.3 Pesquisa dos Genes de betalactamases e *mcr-1*

Entre os isolados analisados de leite cru, 27,3% (3/11) carregavam determinantes de resistência aos betalactâmicos, enquanto entre os isolados clínicos foram detectados 50% (13/26). A alta incidência de determinantes de resistência nas cepas clínicas quando comparadas aos isolados de origem animal deve-se, principalmente, a utilização de antibioticoterapia pelos pacientes que induz a seleção de cepas resistentes (FUGA et al.,

2022). Além disso, a capacidade de disseminação de microrganismos no ambiente hospitalar é facilitada pela presença de fômites e o contato entre pacientes e a equipe de saúde. Porém, a transferência de genes de resistência entre microrganismos de diferentes origens é um dos principais problemas atuais de saúde pública, associados à RAM (PETERSON, KAUR, 2018; COSTA-JÚNIOR et al., 2021).

Em relação aos genes de oxacilinases não carbapanemases, *bla*_{OXA-1} foi detectado em uma (9,1%) amostra de leite e quatro (15,4%) clínicas. Entre os genes que codificam ESBLs, o *bla*_{CTM-M-1/2} foi o gene mais prevalente em ambos os tipos amostrais, em cepas de *E. coli* de leite cru foi detectado em 18,2% (2/11) dos isolados e nas cepas clínicas em 23,1% (6/26), demonstrando incidência semelhante entre esses. Estudos destacam a importância desse gene na resistência aos betalactâmicos em cepas de *E. coli*, nos quais esses isolados apresentam alta incidência associado ao perfil fenotípico ESBL em amostras de origem humana e animal (KÜREKCI et al., 2019; SONCINI et al., 2022; FUGA et al., 2022). Similarmente, Kürekci et al. (2019) descreveram a incidência do *bla*_{CTX-M} em 78,6% das cepas de *E. coli* isoladas de leite cru na Turquia. No entanto, em amostras de tanques de leite da China, foi em apenas 1,5% (1/67) dos isolados. Nas cepas de *E. coli* de amostras humanas, pesquisas descrevem incidências do gene *bla*_{CTM-M-1/2} de 16,7% (DAGA et al., 2019) e 5% (GONÇALVEZ et al., 2016). Além disso, um estudo realizado no Brasil que avaliou a presença da CTX-M em 91 isolados de *E. coli* de diferentes origens biológicas, incluindo carne de frango, carne de porco e isolados clínicos humanos, detectou a incidência dessa enzima em 54,9% dos isolados (SONCINI et al., 2022)

GES foi identificada em 19,2% (5/26) das cepas clínicas, não sendo detectada entre as amostras de leite cru. A incidência de GES em isolados clínicos de Enterobacterales tem apresentado um representativo aumento nos últimos anos (HERNANDEZ-FLORES et al., 2018). Tiemtoré et al., (2022) detectaram o gene *bla*_{GES} em 67% dos isolados de *E. coli* caracterizados fenotipicamente como ESBL, em amostra de um hospital da África ocidental. Estudos anteriores não correlacionavam o fenótipo de resistência ESBL em cepas de *E. coli* à presença dessa enzima (REZAI et al., 2014; GONÇALVEZ et al., 2016). SHV foi detectada em uma (3,8%) única amostra de origem humana. O gene *bla*_{SHV} abrange um grande número de variáveis alélicas que podem estar relacionados a betalactamases não ESBL e/ou ESBL (CERGOLE-NOVELLA et al., 2015; TOOKE et al., 2019), como foi observado no presente

estudo. A cepa MA03, carreadora do gene *bla_{SHV}* apresentou resistência a cefalosporinas de primeira e segunda geração e sensibilidade às de terceira e quarta geração.

Entre os genes de carbapenemases analisados no presente estudo, somente o *bla_{NDM}* foi detectado em uma (3,8%) amostra clínica de *swab* retal. Além disso, trata-se do primeiro reporte de *Enterobacteriaceae* portadora de *bla_{NDM}* no estado da Paraíba, Brasil. Esse fato pode estar relacionado a escassez de estudos direcionados a análises epidemiológica molecular de microrganismos MDR no estado, pois, são reportadas cepas portadoras desse gene em outros estados do país (CARVALHO-ASSEF et al, 2013; BARBERINO et al., 2018; BARTLEY et al., 2019; BELTRÃO et al., 2022).

No Brasil, as primeiras bactérias produtoras de NDM foram detectadas na região sul no ano de 2013 (CARVALHO-ASSEF et al, 2013). O gene *bla_{NDM}* têm sido associado com vários elementos genéticos móveis, o que pode estar relacionado a efetiva capacidade da sua disseminação entre as bactérias Gram-negativas. Além disso, até o momento, foram descritas sete variáveis, *bla_{NDM}*-1 a *bla_{NDM}*-7 (BELTRÃO et al., 2022).

Não foram identificadas cepas portadoras do gene *mcr-1* no presente estudo, apesar de estudos reportarem a presença desse gene em cepas de enterobactérias de diferentes origens, humana, animal e ambiental no nordeste do Brasil (ROCHA et al., 2020; CORDEIRO-MOURA et al., 2022). No entanto, existem outros mecanismos de resistência às polimixinas que não estão relacionados a presença do gene *mcr* (LIU et al., 2016; COSTA-JÚNIOR et al., 2022).

3.4 Caracterização da Produção de Biofilme

Entre os isolados analisados pelo método de CV, 65% (24/37) foram classificados como formadores de biofilme, dos quais somente uma amostra de origem clínica foi caracterizada como moderadamente produtora e todas as outras foram classificadas como fracamente produtoras. Além disso, as amostras clínicas demonstram maior proporção de cepas capazes de produzir biofilme, 73,1% (19/24) quando comparado aos isolados de leite 45,4% (5/11), no qual a incidência de cepas não formadoras foi maior. A capacidade de formação de biofilme é considerada um dos principais fatores de virulência associado a eficiência das cepas de *E. coli* na patogênese das ITUs. Dessa forma, bactérias produtoras de

biofilme são frequentemente isoladas em uroculturas, similar aos resultados obtidos no presente estudo (CERGOLE-NOVELLA et al., 2015; KATONGOLE et al., 2020).

Katongole et al. (2020) analisaram a capacidade de produção de biofilme de 200 isolados de *E. coli* de amostras de urocultura e evidenciaram 62,5% dos isolados como formadores, dos quais 64% foram considerados como MDR. No presente estudo, entre o total de isolados de amostras clínicas considerados como formadores de biofilme 47,4% (9/19) foram MDR, enquanto entre as amostras de leite, somente dois isolados foram produtores de biofilme e MDR. A disseminação de patógenos MDR e produtor de biofilme no ambiente hospitalar representa um sério problema de saúde pública. A matriz polimérica ocasionada pela formação do biofilme é um fator de patogenicidade importante que tornam as bactérias altamente resistentes aos antimicrobianos e a imunidade do hospedeiro, acarretando em falha terapêutica. Além disso, os biofilmes criam o ambiente propício para a troca de elementos genéticos entre diferentes populações bacterianas (COSTA-JÚNIOR et al., 2018; SILVA et al., 2021).

O rastreio de isolados produtores de biofilme pode ser facilitado utilizando a técnica de crescimento em ágar Vermelho-congo, por ser uma metodologia mais simples e de fácil uso (BRANCO et al., 2016; COSTA-JÚNIOR et al., 2018). Lima et al. (2017) reportaram imprecisão dessa metodologia em detectar cepas produtoras de biofilme em bactérias Gram-negativas. Porém, Dadawala et al. (2010) reportaram concordância maior que 80% nessa metodologia a partir da análise com cepas de *E. coli* de origem animal, quando comparado ao método de coloração com CV, considerado o padrão-ouro. No presente estudo foi observado uma concordância de 73% entre os métodos. Porém, o valor de coeficiente Kappa foi de 0.28 (DP = 0,13), classificando o método como insatisfatório para a detecção da capacidade de biofilme em cepas de *E. coli*. Esse fato pode estar relacionado a ineficiência na identificação de cepas não formadoras de biofilme, pois, dos isolados clínicos analisados no presente estudo 100% foram classificados como formadores de biofilme pelo método de crescimento em ágar Vermelho-congo, com o surgimento de colônias com coloração enegrecida (Figura 3), enquanto entre as cepas de leite cru, 72,7% foram considerados como formadoras.

Figura 3. Representação de cepa formadora e não formadora de biofilme pelo método de ágar

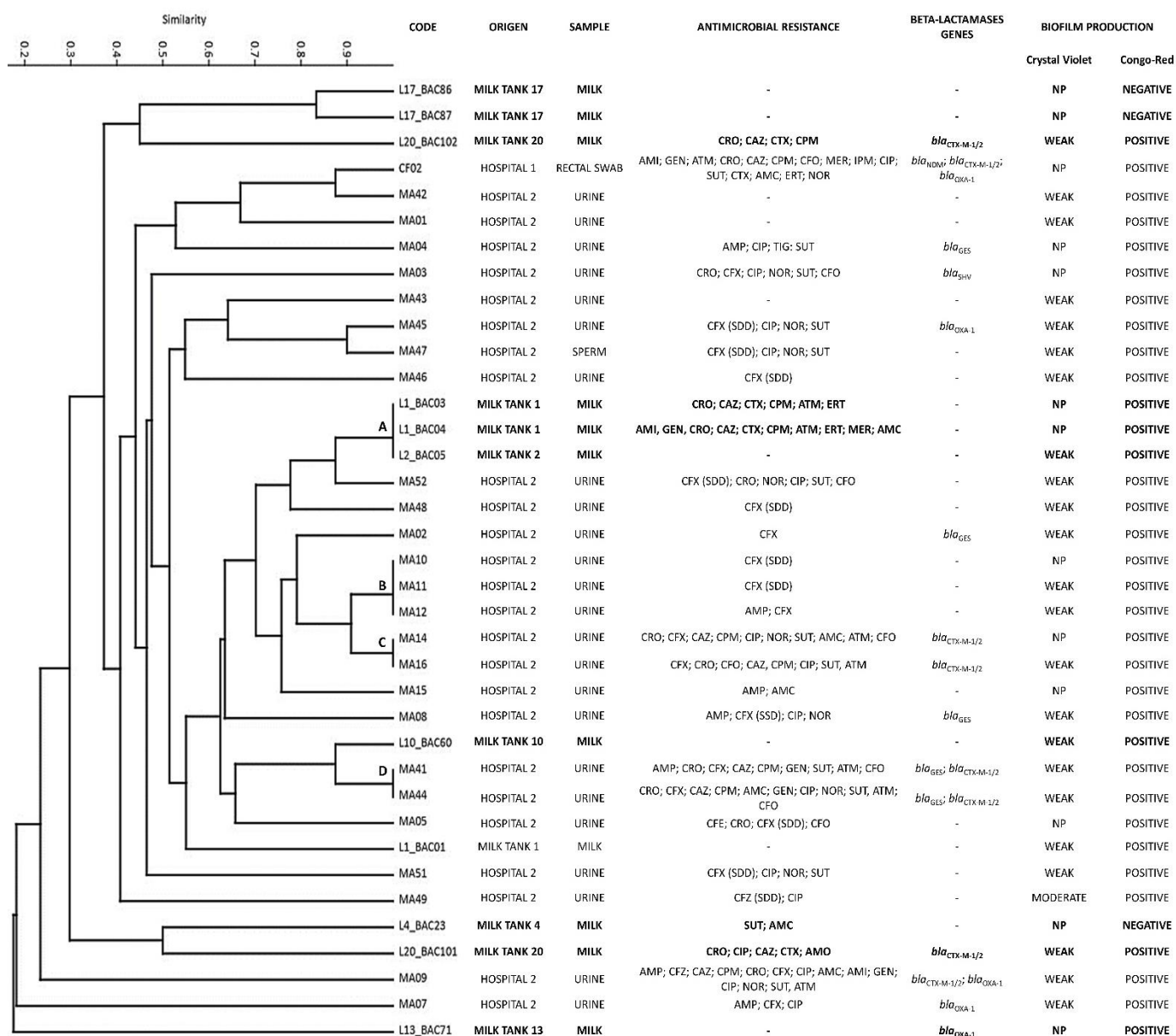


Vermelho-congo.

Em (A) a cepa MA49, positiva para a formação de biofilme com crescimento de colônias enegrecidas. Em (B) a cepa L4_BAC23, negativa para a formação de biofilme com crescimento de colônias avermelhadas.

3.5 Genotipagem

Para verificar o índice de clonalidade entre os isolados de *E. coli* foi utilizada a técnica de ERIC-PCR (Figura 4), técnica molecular que possibilita averiguar a variabilidade clonal a partir de comparações das sequências repetitivas altamente conservadas nas regiões intergênicas do genoma bacteriano de cepas homólogas. Dessa forma, foram observados 31 perfis clonais, com surgimento de quatro clones importantes: denominadas de A (L1_BAC3, L1_BAC4 e L2_BAC5), B (MA10, MA11 e MA12), C (MA14 e MA16) e D (MA41 e MA44).

Figura 4. Genotipagem das amostras de *E. coli* isoladas de leite cru e amostras clínicas do

estado da Paraíba, Brasil.

NP: Não produtor; AMC: Amoxicilina/Ácido clavulânico; AMP: Ampicilina; ATM: Aztreonam; CRO: Ceftriaxona; CFX: Cefalexina; TIG: Tigeciclina; IPM: Imipenem; CIP: Ciprofloxacino; MER: Meropenem; AMI: Amicacina; ETP: Ertapenem; GEN: Gentamicina; CAZ: Ceftazidima; CPM: Cefepime; CFO: Cefoxitina; SUT: Sufametoxazol/Trimetoprim; NOR: Norfloxacin; SSD: Sensível Dose-Dependente

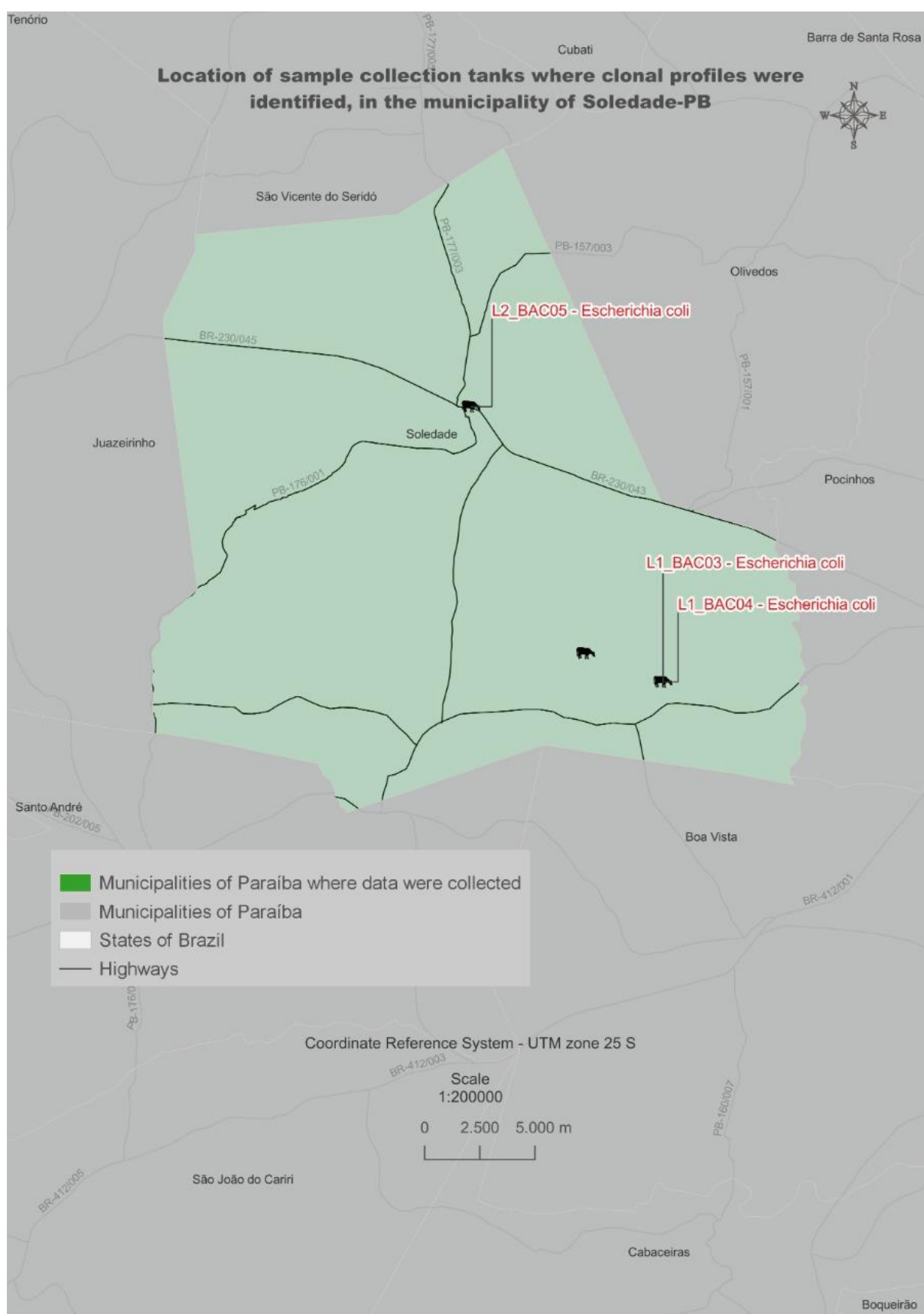
Foram observadas amostras de leite cru coletadas de dois tanques de leite diferentes, porém que pertenciam ao mesmo município do estado da Paraíba, apresentando 100% de similaridade. As amostras L1_BAC3 e L1_BAC4 obtidas a partir do processamento do leite 1, foram caracterizadas como genotipicamente semelhantes à amostra L2_BAC5, que estava presente na amostra de leite 2. Dessa forma, é possível observar uma disseminação de um mesmo clone entre os tanques de leite do município de Soledade, Paraíba (Figura 5), indicando uma possível rota de disseminação de *E. coli* neste estado. As vias de disseminação desse microrganismo entre os tanques de leite podem estar relacionadas ao trânsito de profissionais, redes de escoamento do leite ou até mesmo ao consumo do leite pela população. Kürekcı et al. (2019) analisaram a disseminação de *E. coli* produtora de ESBL em amostras de leite cru e carne de frango na Turquia, pelo método de Eletroforese em Campo-Pulsante (PFGE) e observaram a presença de clones em amostras de leite pertencentes a animais de diferentes fazendas em uma mesma região. Além disso, esses isolados foram identificados como portadores do gene *bla*_{CTX-M}. Ademais, o estudo reportou a presença de clones entre amostras de leite e carne de frango, destacando a disseminação desse patógeno em animais da região (KÜREKCI et al., 2019), similarmente ao presente estudo.

Nos isolados clínicos foi observado a disseminação de clones no ambiente hospitalar, correspondentes aos seguintes grupos clonais: B, C e D. Um composto por três isolados e outros dois compostos por dois, pertencentes a um mesmo hospital de origem. Além disso, os grupos clonais C e D foram identificados como carreadores do determinante de resistência *bla*_{CTX-M}. Dessa forma, pode-se sugerir uma disseminação de cepas MDR no ambiente hospitalar, que estão relacionadas a dificuldade de tratamento e aumento de tempo de morbimortalidade dos pacientes. Ademais, é importante destacar que esses isolados foram coletados durante o período de pandemia da COVID-19, a associação dessa doença com infecções secundárias é considerada um fator prognóstico importante para os pacientes (HUANG et al., 2020; AYDEMIR et al., 2022).

Além disso, o presente estudo detectou isolados de diferentes hospitais apresentando índice de similaridade maior que 80%. Dessa forma, é impossível sugerir uma ancestralidade entre essas amostras e identificar uma disseminação que pode estar associada a infecções comunitárias. Cepas de diferentes hospitais apresentando clonalidade foram apontadas

anteriormente no estado de Pernambuco, Brasil, a partir da análise do perfil clonal de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* utilizando a técnica de ERIC-PCR, assim como no presente estudo (ARAUJO-LIMA et al., 2020).

Figura 5. Disseminação do grupo clonal das bactérias L1_BAC3, L1_BAC4 e L2_BAC5 isoladas de diferentes tanques de leite cru do município de Soledade-PB.



Estudos destacam a importância das análises de epidemiologia molecular no controle da RAM nos bacilos Gram-negativos (ARAUJO-LIMA et al., 2020, SILVA et al., 2021; COSTA-JÚNIOR et al., 2022; FUGA et al., 2022). Estes microrganismos, incluindo a *E. coli*, são considerados como de alta prioridade pela *World Health Organization* (WHO, 2017), principalmente pelos problemas acarretados na saúde pública associados a esses patógenos. A disseminação desses microrganismos entre humano, animal e ambiente é outra situação preocupante (FUGA et al., 2022). No presente estudo foi observado cepas isoladas de leite e isolados clínicos apresentando similaridade superior a 80%, sendo este dado um indicativo de ancestralidade entre essas amostras e sugerindo uma interação microbiológica entre humano e animal (DUAN et al., 2009; COSTA-JÚNIOR et al., 2021). Além disso, foi observado a disseminação de cepas MDR e produtoras de biofilme em isolados clínicos e amostras de leite.

4 Conclusão

A disseminação de clones de *E. coli* em diferentes tanques de leite do município de Soledade e entre pacientes hospitalizados na Paraíba é indicativa da rota de dispersão desse microrganismo no estado. Consequentemente, o surgimento de clones de *E. coli* MDR portadores de genes de resistência aos betalactâmicos representa um grande problema de saúde pública e enfatiza a necessidade das medidas de controle da RAM na região. A emergência da produção de NDM no estado da Paraíba é um indicativo importante da disseminação de microrganismos produtores dessa enzima na região Nordeste, reforçando a necessidade da pesquisa do determinante de resistência dessa betalactamase na região como um fator preventivo da RAM. Além disso, a maior prevalência de cepas produtoras de biofilme nas amostras clínicas, quando comparadas as amostras de leite cru, reforça a associação de cepas mais virulentas entre as ITUs em humanos. Dessa forma, o estudo destaca a importância da perspectiva *One Health* no combate a RAM, principalmente, relacionada a disseminação de cepas de *E. coli* produtoras de CTX-M em animais, alimentos e isolados clínicos humanos.

5 Referências

- Alav I, Sutton JM, Rahman KM (2018) Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother* 73:2003–2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>.
- Araújo Lima AV, da Silva SM, do Nascimento Júnior JAA, et al (2020) Occurrence and Diversity of Intra- and Interhospital Drug-Resistant and Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Drug Resistance* 26:802–814.

- <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0214>
- Aydemir O, Aydemir Y, Şahin EÖ, et al (2022) Secondary bacterial infections in patients with coronavirus disease 2019-associated pneumonia. *Rev Assoc Med Bras* 68:142–146. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.20210745>.
- Barberino MG, Cruvinel S de A, Faria C, et al (2018) Isolation of *bla*NDM-producing *Enterobacteriaceae* in a public hospital in Salvador, Bahia, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 22:47–50. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.10.002>.
- Bartley PS, Domitrovic TN, Moretto VT, et al (2019) Antibiotic Resistance in Enterobacteriaceae from Surface Waters in Urban Brazil Highlights the Risks of Poor Sanitation. *Am J Trop Med Hyg* 100:1369–1377. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0726>.
- Beltrão EMB, Oliveira ÉM de, Scavuzzi AML, et al (2022) Virulence factors of *Proteus mirabilis* clinical isolates carrying *bla*KPC-2 and *bla*NDM-1 and first report *bla*OXA-10 in Brazil. *Journal of Infection and Chemotherapy* 28:363–372. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2021.11.001>
- Botrel M-A, Haenni M, Morignat E, et al (2010) Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. *Foodborne Pathog Dis* 7:479–487. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0425>.
- Branco LO, Chagas LGS, Melo RT, et al (2016) Biofilm production by *Escherichia coli* in poultry water drinkers. *RBCV* 23:133–137. <https://doi.org/10.4322/rbcv.2016.044>.
- BrCAST. Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos. 2022. Available from: <http://brcast.org.br/>
- Carvalho I, Carvalho JA, Martínez-Álvarez S, et al (2021) Characterization of ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Samples in a Northern Portuguese Hospital: Predominance of CTX-M-15 and High Genetic Diversity. *Microorganisms* 9:1914. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091914>
- Carvalho-Assef APD, Pereira PS, Albano RM, et al (2013) Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68:2956–2957. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt298>.
- Cergole-Novella MC, Pignatari ACC, Guth BEC (2015) Adhesion, biofilm and genotypic characteristics of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates. *Braz J Microbiol* 46:167–171. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120140077>
- Codjoe FS, Donkor ES (2017) Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci (Basel)* 6:E1. <https://doi.org/10.3390/medsci6010001>.
- Cordeiro-Moura JR, Kraychete GB, Longo LG de A, et al (2022) Description and comparative genomic analysis of a *mcr-1*-carrying *Escherichia coli* ST683/CC155 recovered from touristic coastal water in Northeastern Brazil. *Infect Genet Evol* 97:105196. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105196>.
- Costa-Júnior SD, Campos LA de A, Campos LA de A, Ferro Cavalcanti IM (2018) Silver Nanoparticles as a Promising Therapeutic Strategy for Infections Caused by Resistant Bacteria in Cattle and Birds. *APDV* 4:1–5.
- Costa-Júnior SD, da Silva AMCM, Niedja da Paz Pereira J, et al (2021) Emergence of *rmtD1* gene in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* carrying *bla*KPC and/or *bla*VIM-2 genes in Brazil. *Braz J Microbiol* 52:1959–1965. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00576-2>.
- Dadawala AI, H.c C, Chandel, et al (2010) Assessment of *Escherichia coli* isolates for In vitro biofilm production. *Veterinary World* 3:364–366.
- Daga AP, Koga VL, Soncini JGM, et al (2019) *Escherichia coli* Bloodstream Infections in Patients at a University Hospital: Virulence Factors and Clinical Characteristics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9.
- Duan H, Chai T, Liu J, et al (2009) Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environmental Research* 109:511–517.

- <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.02.014>.
- Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT (1989) New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology* 42:872–874. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>.
- Fuga B, Sellera FP, Cerdeira L, et al (2022) WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. *Microbiol Spectr* 10:e01256-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01256-21>.
- Garcia-Vidal C, Sanjuan G, Moreno-García E, et al (2021) Incidence of co-infections and superinfections in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study. *Clinical Microbiology and Infection* 27:83–88. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.07.041>.
- Gonçalves LF, de Oliveira Martins-Júnior P, de Melo ABF, et al (2016) Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in the Central-Western Region, Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 6:1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.02.003>.
- Hernandez-Flores JL, Pérez JC, Gutiérrez CS, et al (2018) pMEX01, a 70kb plasmid isolated from *Escherichia coli* that confers resistance to multiple β -lactam antibiotics. *Brazilian Journal of Microbiology* 49:569–574. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.11.002>.
- Huang C, Wang Y, Li X, et al (2020) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* 395:497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).
- Jácome PRL de A, Alves LR, Jácome-Júnior AT, et al (2016) Detection of *bla*SPM-1, *bla*KPC, *bla*TEM and *bla*CTX-M genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. *J Med Microbiol* 65:658–665. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000280>.
- Katongole P, Nalubega F, Florence NC, et al (2020) Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical isolates in Uganda. *BMC Infectious Diseases* 20:453. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05186-1>.
- Kürekci C, Osek J, Aydın M, et al (2019) Evaluation of bulk tank raw milk and raw chicken meat samples as source of ESBL producing *ESCHERICHIA COLI* in Turkey: Recent insights. *Journal of Food Safety* 39:e12605. <https://doi.org/10.1111/jfs.12605>.
- Lambrecht E, Van Coillie E, Van Meervenne E, et al (2019) Commensal *E. coli* rapidly transfer antibiotic resistance genes to human intestinal microbiota in the Mucosal Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (M-SHIME). *Int J Food Microbiol* 311:108357. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108357>.
- Lima JL da C, Alves LR, da Paz JNP, et al (2017) Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-associated pneumonia. *Rev Bras Ter Intensiva* 29:310–316. <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20170039>.
- Liu H, Meng L, Dong L, et al (2021) Prevalence, Antimicrobial Susceptibility, and Molecular Characterization of *Escherichia coli* Isolated From Raw Milk in Dairy Herds in Northern China. *Frontiers in Microbiology* 12.
- Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, et al (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases* 16:161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).
- Lomaestro BM, Tobin EH, Shang W, Gootz T (2006) The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* to upstate New York. *Clin Infect Dis* 43:e26-28. <https://doi.org/10.1086/505598>.
- Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, et al (2007) Rapid Detection and Identification of Metallo- β -Lactamase-Encoding Genes by Multiplex Real-Time PCR Assay and Melt Curve Analysis. *J*

- Clin Microbiol 45:544–547. <https://doi.org/10.1128/JCM.01728-06>.
- Nicoletti AG, Marcondes MFM, Martins WMBS, et al (2015) Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 59:5159–5164. <https://doi.org/10.1128/AAC.00158-15>.
- Núñez-Samudio V, Pecchio M, Pimentel-Peralta G, et al (2021) Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Clinical Isolates from Central Panama. Antibiotics 10:899. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080899>.
- Oliveira Santos JV, da Costa Júnior SD, de Fátima Ramos dos Santos Medeiros SM, et al (2022) Panorama of Bacterial Infections Caused by Epidemic Resistant Strains. Curr Microbiol 79:175. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02875-9>.
- Peleg AY, Hooper DC (2010) Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. N Engl J Med 362:1804–1813. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0904124>
- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND (2002) Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. J Clin Microbiol 40:2153–2162. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002>.
- Peterson E, Kaur P (2018) Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. Frontiers in Microbiology 9.
- Poirel L, Benouda A, Hays C, Nordmann P (2011) Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. J Antimicrob Chemother 66:2781–2783.
- Rezai MS, Salehifar E, Rafiei A, et al (2015) Characterization of Multidrug Resistant Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* among Uropathogens of Pediatrics in North of Iran. BioMed Research International 2015:e309478 <https://doi.org/10.1155/2015/309478>.
- Rocha IV, Dos Santos Silva N, das Neves Andrade CA, et al (2020) Diverse and emerging molecular mechanisms award polymyxins resistance to *Enterobacteriaceae* clinical isolates from a tertiary hospital of Recife, Brazil. Infect Genet Evol 85:104584 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104584>.
- Silva FA da, Medeiros SM de FR dos S, Costa-Junior SD da, et al (2020) Antimicrobial Resistance Profile and Biofilm Production of Microorganisms Isolated from Oropharynx of *Rupornis magnirostris* (Gmelin, 1788) and *Caracara plancus* (Miller, 1777). Veterinary Medicine International 2020:e8888618. <https://doi.org/10.1155/2020/8888618>.
- Silva GG da C, Campana EH, Vasconcelos PC, et al (2020) Occurrence of KPC-Producing *Escherichia coli* in Psittaciformes Rescued from Trafficking in Paraíba, Brazil. IJERPH 18:95. <https://doi.org/10.3390/ijerph18010095>.
- Soncini JGM, Cerdeira L, Sano E, et al (2022) Genomic insights of high-risk clones of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from community infections and commercial meat in southern Brazil. Sci Rep 12:9354. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13197-y>.
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS 115:891–899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
- Tiemtoré RYW, Mètuor Dabiré A, Ouermi D, et al (2022) Isolation and Identification of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains Resistant to the Oxyimino-Cephalosporins and the Monobactam by Production of GES Type Extended Spectrum Bêta-Lactamase (ESBL) at Saint Camille Hospital Center in Ouagadougou, Burkina Faso. Infect Drug Resist 15:3191–3204. <https://doi.org/10.2147/IDR.S360945>.
- Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, et al (2019) β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. J Mol Biol 431:3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- WHO. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics

for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis
<https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-EMP-IAU-2017.12>. Accessed 3 Dec 2022.

5 CONCLUSÃO

A trajetória da incidência do gene *mcr* nas bactérias Gram-negativas do Brasil pode ser usada como exemplo da necessidade de estudos que destaquem e utilizem a abordagem *One Health*, além da importância da epidemiologia molecular no controle da resistência bacteriana.

O estudo revelou que existe uma elevada incidência de cepas de *E. coli* resistentes e formadoras de biofilme em amostras da cloaca de *C. plancus* e leite bovino cru, o que demonstra a importância de ações de monitoramento epidemiológico na região.

A identificação de cepas produtoras de ESBL entre aves da espécie *C. plancus* na região nordeste do Brasil, indica o papel desses animais na dispersão dessas cepas nesta localidade. O dado do primeiro reporte de *E. coli* isolada de animais portadora de *bla_{KPC}* com susceptibilidade aos carbapenéns, é um possível indicativo da interação com humanos.

A presença de clones bacterianos em diferentes aves, portando genes de resistência aos betalactâmicos revela a possível transmissão entre *C. plancus* e humanos, devido à permanência desses animais nos centros urbanos.

A predominância do gene *bla_{CTX-M-1/2}* como determinante genético em cepas de *E. coli* produtoras de ESBL de diferentes origens: amostras clínicas, leite bovino e espécimes da cloaca de aves, demonstra que esse possui forte relação com o fenótipo ESBL em cepas de *E. coli* isolados no nordeste do Brasil e destaca a importância dos estudos de epidemiologia molecular direcionados ao rastreio desse gene na região, visando estimular medidas de controle na disseminação da RAM e salienta a importância da aplicação da perspectiva do modelo *One Health*.

O primeiro reporte de cepa portadora do gene *bla_{NDM}* no estado da Paraíba e a co-ocorrência dos genes: *bla_{NDM}*, *bla_{CTX-M-1/2}* e *bla_{OXA-1}* em isolado clínico de *swab* retal demonstra que estudos futuros associados a pesquisa desse gene em amostras de origem animal são importantes para a análise da dispersão da RAM no estado da Paraíba e perspectivas de enfrentamento a disseminação desses microrganismos.

A disseminação de clones de *E. coli* em diferentes tanques de leite do município de Soledade,

no estado da Paraíba revela uma rota de dispersão desse microrganismo no estado.

A disseminação de clones de *E. coli* MDR portadores de genes de resistência aos betalactâmicos em um hospital do estado da Paraíba, enfatiza a necessidade das medidas do controle da RAM no ambiente hospitalar.

A alta prevalência de *E. coli* produtora de biofilmes isoladas de diferentes origens, apresentando prevalências semelhantes entre as cepas isoladas de aves e amostras clínicas e menor entre as cepas de leite cru reforça a associação de cepas mais virulentas entre os animais e humanos, quando comparadas as amostras de alimentos.

6 SÚMULA CURRICULAR (2020 – 2022)

Nome: Sérgio Dias da Costa Júnior

Link para páginas da web:

Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0002-2501-3284>

Plataforma lattes: <http://lattes.cnpq.br/5696911475825844>

ResearchGate: <https://www.researchgate.net/scientific-contributions/Sergio-Dias-da-Costa-Junior-2149185337>

Formação

Formação acadêmica:

Ano	Título ou Atividade	Instituição
2018	Graduação - Biomedicina	Universidade Federal de Pernambuco
2020	Especialista - Microbiologia Clínica	Universidade de Pernambuco
2020	Mestre – Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical	Universidade Federal de Pernambuco
2022	Especialista – Análises Clínicas e Toxicológicas	Faculdade Joaquim Nabuco
2022	Doutorando – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas	Universidade Federal de Pernambuco

Formação complementar (2020-2022)

Ano	Curso (carga horária)	Instituição
2021	BIOSSEGURANÇA E A COVID-19: RISCOS E MEDIDAS PARA BOAS PRÁTICAS NA UFPB. (Carga horária: 60h)	Universidade Federal da Paraíba
2020	Gerenciamento de Resíduos em Laboratórios. (Carga horária: 30h).	Universidade Federal da Paraíba,

2020	INICIAÇÃO AO SERVIÇO PÚBLICO. (Carga horária: 100h).	Universidade Federal da Paraíba,
------	---	-------------------------------------

Histórico Profissional (2020-2022)

Servidor Público (Técnico de Laboratório Área/análises clínicas) – Laboratório de Microbiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia – Centro de Ciências da Saúde (40h). Período: novembro de 2019 – atual.

Biomédico Microbiologista do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Doenças Infectocontagiosas Dr. Clementino Fraga (plantonista 24h). Período: março 2020 – janeiro 2022.

Biomédico Plantonista Hospital Prontovida (plantonista 24h). Período: julho 2020 – julho 2021).

Produção Acadêmica (2020-2022)

Artigos Publicados:

- COSTA-JÚNIOR, Sérgio Dias et al. Dissemination and prevalence of polymyxin-resistant bacteria of clinical and environmental origin. RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT, v. 11, p. e94111334996-1, 2022.
- SILVA, Júlio Eduardo barbosa et al. Utilização de aminoglicosídeos como estratégia terapêutica para combater infecções causadas por enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido. RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT, v. 11, p. e57711225680-9, 2022.
- Oliveira Santos, João Victor et al. Panorama of Bacterial Infections Caused by Epidemic Resistant Strains. CURRENT MICROBIOLOGY, v. 79, p. 175-184, 2022.
- COSTA-JÚNIOR, Sérgio Dias et al. Emergence of rmtD1 gene in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* carrying blaKPC and/or blaVIM-2 genes in Brazil. BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, v. 1, p. 1-10, 2021.
- SILVA, Adriana Maria Costa et al. Investigation of the association of virulence genes and biofilm production with infection and bacterial colonization processes in multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, v. 93, p. 1-13, 2021.
- SILVA, Roberta Caroline de Oliveira et al. Caracterização fenotípica do perfil de resistência de bactérias isoladas da unidade de alimentação/nutrição em um hospital público de Recife-PE. RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT, v. 10, p. e32610514782-10, 2021.

- SILVA, Fernanda Alda et al. Antimicrobial Resistance Profile and Biofilm Production of Microorganisms Isolated from Oropharynx of (Gmelin, 1788) and (Miller, 1777). VETERINARY MEDICINE INTERNATIONAL, v. 2020, p. 1-10, 2020.
- COSTA-JÚNIOR, Sérgio Dias et al. Synergistic Effect between Usnic Acid and Polymyxin B against Resistant Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, v. 2020, p. 1-9, 2020.

Capítulos de Livros:

- MARTINS, Carla Castelo Branco; BOTELHO, Larissa Farias; SANTOS, Eduarda Melquiades Pirette dos; SANTOS, JOÃO VICTOR DE OLIVEIRA; COSTA-JUNIOR, SÉRGIO DIAS DA; CAVALCANTI, ISABELLA MACÁRIO FERRO. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO PERFIL DE RESISTÊNCIA E PRODUÇÃO DE BIOFILME DE ISOLADOS CLÍNICOS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS. PESQUISAS EM TEMAS DE CIÊNCIAS DA SAÚDE. 1ed.Belém: RFB Editora, 2020, v. 3, p. 69-82.
- COSTA-JUNIOR, SÉRGIO DIAS DA. DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 NA UFPB: DA ESTRUTURAÇÃO DOS LABORATÓRIOS ATÉ A ROTINA LABORATORIAL. In: Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz; Reinaldo Farias Paiva de Lucena; Aluísio Mario Lins Souto; Eduardo Sérgio Soares Sousa; João Euclides Fernandes Braga. (Org.). DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 NA UFPB: DA ESTRUTURAÇÃO DOS LABORATÓRIOS ATÉ A ROTINA LABORATORIAL. 1ed.João Pessoa: Editora UFPB, 2020, v. 1, p. 65-66.

Participação como Ministrante de Minicursos

COSTA JR, S. D. Métodos para detecção de resistência bacteriana. 2022. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

Orientações Concluídas

Monografia de Conclusão de Curso de Aperfeiçoamento/Especialização:

- Wagner Roberto Cirilo da Silva. EFEITO SINÉRGICO DE PRODUTOS NATURAIS E ANTIBIÓTICOS FRENTE A Pseudomonas aeruginosa MULTIDROGA-RESISTENTE: UMA REVISÃO DE LITERATURA. 2022. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Microbiologia Clínica) - Universidade de Pernambuco. Orientador: Sergio Dias da Costa Júnior.
- João Victor de Oliveira Santos. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE LECTINA EXTRAÍDA DA FOLHA DE Guazuma ulmifolia LAM E SUA INTERAÇÃO COM POLIMIXINA B. 2022. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Microbiologia Clínica) - Universidade de Pernambuco. Orientador: Sergio Dias da Costa Júnior.

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação

- Tiago José Elias de Melo. MASTITE INFECCIOSA CAUSADA POR BACTÉRIAS RESISTENTES E PRODUTORAS DE BIOFILME EM HUMANOS: UMA REVISÃO INTEGRATIVA. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco. Orientador: Sergio Dias da Costa junior.
- Ísis Catharine Rodrigues Nascimento. IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* COM RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS ISOLADOS DE ESTETOSCÓPIOS DE ESTUDANTES DE ENFERMAGEM EM UM CENTRO ACADÊMICO DE PERNAMBUCO. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Enfermagem) - Universidade Federal de Pernambuco. Orientador: Sergio Dias da Costa junior.
- Marcielle dos Santos Santana. IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVA COM RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E PRODUTORES DE BIOFILME ISOLADOS DE ESTETOSCÓPIOS DE ESTUDANTES DE ENFERMAGEM EM UM CENTRO ACADÊMICO DE PERNAMBUCO. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Enfermagem) - Universidade Federal de Pernambuco. Orientador: Sergio Dias da Costa junior.
- Ylanna Larissa Alves Ferreira. BACILOS GRAM-NEGATIVOS PORTADORES DO GENE *mcr* NO BRASIL: UM PATÓGENO EM ASCENSÃO. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Faculdade São Miguel. Orientador: Sergio Dias da Costa junior.

REFERÊNCIAS

- ALAV, Ilyas; SUTTON, J Mark; RAHMAN, Khondaker Miraz. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2003–2020, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article/73/8/2003/4913710>>. Acesso em: 8 nov. 2022.
- ALEGBELEYE, Oluwadara Oluwaseun; GUIMARÃES, Jonas T.; CRUZ, Adriano G.; *et al.* Hazards of a ‘healthy’ trend? An appraisal of the risks of raw milk consumption and the potential of novel treatment technologies to serve as alternatives to pasteurization. **Trends in Food Science & Technology**, v. 82, p. 148–166, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224418302929>>. Acesso em: 4 dez. 2022.
- ARAÚJO, Lorena de Lourdes Costa; AZEVEDO, Francisco Honeidy Carvalho. Estudo da enzima beta-lactamase e sua relação com a resistência aos antibióticos. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e663974594–e663974594, 2020. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/4594>>. Acesso em: 8 nov. 2022.
- ASOKAN, Govindaraj; RAMADHAN, Tufoof; *et al.* WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medline-PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. **Oman Medical Journal**, v. 34, n. 3, p. 184–193, 2019. Disponível em: <<http://www.omjournal.org/articleDetails.aspx?coType=1&aId=2452>>. Acesso em: 8 nov. 2022.
- BALDOTTO, Suelen Berger; SOMMA, André Tavares; LANGE, Rogério Ribas; *et al.* The crested caracara (*Caracara plancus*) eye: Morphologic observations and results of selected diagnostic tests. **Veterinary Ophthalmology**, v. 24, n. 5, p. 533–542, 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vop.12939>>. Acesso em: 8 nov. 2022.
- BALKHY, Hanan H.; EL-SAED, Aiman; ALSHAMRANI, Majid M.; *et al.* Ten-year resistance trends in pathogens causing healthcare-associated infections; reflection of infection control interventions at a multi-hospital healthcare system in Saudi Arabia, 2007–2016. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 21, 2020. Disponível em: <<https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-020-0678-0>>. Acesso em: 8 nov. 2022.
- BARBERINO, Maria Goreth; CRUVINEL, Silvia de Araujo; FARIA, Célio; *et al.* Isolation of blaNDM-producing *Enterobacteriaceae* in a public hospital in Salvador, Bahia, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 47–50, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867017306098>>. Acesso em: 8 nov. 2022.
- BARHEMA, H. W.; KEYSERLINGK, M. A. G. von; KASTELIC, J. P.; *et al.* Invited review: Changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 11, p. 7426–7445, 2015. Disponível em: <[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(15\)00617-7/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(15)00617-7/fulltext)>. Acesso em: 8 nov. 2022.

BARTLEY, Patricia S.; DOMITROVIC, T. Nicholas; MORETTO, Vanessa T.; *et al.* Antibiotic Resistance in *Enterobacteriaceae* from Surface Waters in Urban Brazil Highlights the Risks of Poor Sanitation. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 6, p. 1369–1377, 2019.

BATRA, Aditi; ROEMHILD, Roderich; ROUSSEAU, Emilie; *et al.* High potency of sequential therapy with only β -lactam antibiotics. **eLife**, v. 10, p. e68876, 2021. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/68876>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

BELLO, Alexander; DINGLE, Tanis C. What's That Resistance Mechanism? Understanding Genetic Determinants of Gram-Negative Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 40, n. 20, p. 165–174, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196439918300916>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

BELTRÃO, Elizabeth Maria Bispo; OLIVEIRA, Érica Maria de; SCAVUZZI, Alexsandra Maria Lima; *et al.* Virulence factors of *Proteus mirabilis* clinical isolates carrying blaKPC-2 and blaNDM-1 and first report blaOXA-10 in Brazil. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 28, n. 3, p. 363–372, 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1341321X21003020>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, jan. 2014.

BRANCO, L. O.; CHAGAS, L. G. S.; MELO, R. T.; *et al.* Biofilm production by *Escherichia coli* in poultry water drinkers. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 23, n. 3–4, p. 133–137, 2016. Disponível em: <<http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/rbcv.2016.044>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

CALAHORRANO-MORENO, Micaela Belen; ORDOÑEZ-BAILON, Jonathan Jerry; BAQUERIZO-CRESPO, Ricardo José; *et al.* Contaminants in the cow's milk we consume? Pasteurization and other technologies in the elimination of contaminants. **F1000Research**, v. 11, p. 91, 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8822143/>>. Acesso em: 4 dez. 2022.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D.; PEREIRA, P. S.; ALBANO, R. M.; *et al.* Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956–2957, 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkt298>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (EUA). Healthcare-associated Infections (HAI) Progress Report, 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hai/surveillance/progress-report/>>. Acesso em: 07 set. 2021.

CERGOLE-NOVELLA, Maria C.; PIGNATARI, Antonio C. C.; GUTH, Beatriz E. C. Adhesion, biofilm and genotypic characteristics of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 167–171, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/bjm/a/x9MynDHnYBLcDpFVRsV9jmL/?lang=en>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

CHU, Haiqing; ZHAO, Lan; WANG, Minggui; et al. Sulbactam-based therapy for *Acinetobacter baumannii* infection: a systematic review and meta-analysis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. 389–394, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **CLSI document MO2-A11**. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), p. 69-156, 2019.

CODJOE, F.; DONKOR, E. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1, 21 dez. 2017.

CORDEIRO-MOURA, Jhonatha Rodrigo; KRAYCHETE, Gabriela Bergiante; LONGO, Luís Guilherme de Araújo; et al. Description and comparative genomic analysis of a mcr-1-carrying *Escherichia coli* ST683/CC155 recovered from touristic coastal water in Northeastern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 97, p. 105196, 2022.

COSTA JÚNIOR, Sérgio Dias; DA SILVA, Wagner Roberto Cirilo; DA SILVA, Adriana Maria Costa Marques; et al. Synergistic Effect between Usnic Acid and Polymyxin B against Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, p. e9852145, 2020. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2020/9852145/>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

COSTA-JUNIOR, Sérgio Dias; CAMPOS, Luís André de Almeida; CAMPOS, Luís André de Almeida; et al. Silver Nanoparticles as a Promising Therapeutic Strategy for Infections Caused by Resistant Bacteria in Cattle and Birds. **Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences**, v. 4, n. 3, p. 1–5, 2018. Disponível em: <<http://crimsonpublishers.com/apdv/fulltext/APDV.000592.php>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

COSTA-JÚNIOR, Sérgio Dias; DA SILVA, Adriana Maria Costa Marques; NIEDJA DA PAZ PEREIRA, Jussyêgles; et al. Emergence of rmtD1 gene in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* carrying blaKPC and/or blaVIM-2 genes in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1959–1965, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42770-021-00576-2>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

CURY, Ana Paula; GIRARDELLO, Raquel; DUARTE, Alberto José da Silva; et al. KPC-producing Enterobacterales with uncommon carbapenem susceptibility profile in Vitek 2 system. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 93, p. 118–120, 2020. Disponível em: <[https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(20\)30018-7/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(20)30018-7/fulltext)>. Acesso em: 8 nov. 2022.

DADAWALA, A. I.; H.C, Chauhan; CHANDEL; et al. Assessment of *Escherichia coli* isolates for In vitro biofilm production. **Veterinary World**, v. 3, n. 8.000, p. 364–366, 2010. Disponível em: <<http://www.scopemed.org/mnstemps/2/2-1286561177.pdf>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

DAGA, Ana Paula; KOGA, Vanessa Lumi; SONCINI, João Gabriel Material; et al. *Escherichia coli* Bloodstream Infections in Patients at a University Hospital: Virulence Factors and Clinical Characteristics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9,

p. 191, 2019. Disponível em:

<<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2019.00191/full>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

DE OLIVEIRA SANTOS, João Victor; DA COSTA JÚNIOR, Sérgio Dias; DE FÁTIMA RAMOS DOS SANTOS MEDEIROS, Sandrelli Meridiana; et al. Panorama of Bacterial Infections Caused by Epidemic Resistant Strains. **Current Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 175, 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s00284-022-02875-9>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

DE OLIVEIRA, Gislene B.; FAVARIN, Luciana; LUCHESE, Rosa H.; et al. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 46, n. 2, p. 313–321, 2015.

DE ROSA, Margherita; VERDINO, Anna; SORIENTE, Annunziata; et al. The Odd Couple(s): An Overview of Beta-Lactam Antibiotics Bearing More Than One Pharmacophoric Group. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 617, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/2/617>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

DENAMUR, Erick; CLERMONT, Olivier; BONACORSI, Stéphane; et al. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 37–54, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-020-0416-x>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

DI PILATO, Vincenzo; ARENA, Fabio; TASCINI, Carlo; et al. mcr-1.2 , a New mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 9, p. 5612–5615, 2016. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01075-16>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

DUAN, H. et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v. 109, n. 5, p. 511–517, jul. 2009.

FALAGAS, Matthew E.; SKALIDIS, Tilemachos; VARDAKAS, Konstantinos Z.; et al. Activity of cefiderocol (S-649266) against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria collected from inpatients in Greek hospitals. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 6, p. 1704–1708, 2017.

FERNANDES, Miriam R.; SELLERA, Fábio P.; MOURA, Quêzia; et al. Zooanthroponotic Transmission of Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*, Brazil - Volume 24, Number 6—June 2018 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/6/18-0335_article>. Acesso em: 4 dez. 2022.

FLEMING, Alexander. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. **British journal of experimental pathology**, v. 10, n. 3, p. 226–236, 1929. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048009/>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

FRATONI, Andrew J.; NICOLAU, David P.; KUTI, Joseph L. A guide to therapeutic drug monitoring of β -lactam antibiotics. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 41, n. 2, p. 220–233, 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/phar.2505>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

FREIRE, Samanta; GRILO, Teresa; POIREL, Laurent; et al. Urban Pigeons (*Columba livia*) as a Source of Broad-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Lisbon, Portugal. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 10, p. 1368, 2022.

FUGA, Bruna; SELLERA, Fábio P.; CERDEIRA, Louise; 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. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, p. e01256-21, 2022. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.01256-21>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

GIRARDELLO, Raquel; GALES, Ana Cristina. Resistência às Polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 2, n. 2, p. 66, 2012. Disponível em: <<http://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia/article/view/2504>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

GIRARDELLO, Raquel; PIROUPO, Carlos Morais; MARTINS, Joaquim; et al. Genomic Characterization of mcr-1.1-Producing *Escherichia coli* Recovered From Human Infections in São Paulo, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 663414, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.663414/full>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

GROSS, W. B. Colibacilosis. In: HOFSTAD, M. S.; CALNECK, B. W.; HELMBOD, C. F.; REID, W. M.; YODER, H. W. Disease of poultry. **Ames: Iowa State University Press**, p. 138- 144, 1991.

HERNANDEZ-FLORES, Jose Luis; PÉREZ, Juan Caballero; GUTIÉRREZ, Carlos Saldaña; et al. pMEX01, a 70 kb plasmid isolated from *Escherichia coli* that confers resistance to multiple β -lactam antibiotics. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 569–574, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838217302009>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

HONARDOOST, Maryam; RAJABPOUR, Azam; VAKIL, Ladan. Molecular epidemiology; New but impressive. **Medical Journal of The Islamic Republic of Iran**, v. 32, n. 1, p. 312–316, 2018. Disponível em: <<http://mjiri.iums.ac.ir/article-1-4594-en.html>>. Acesso em: 2 dez. 2022.

JÁCOME, P. R. L. DE A. et al. Detection of blaSPM-1, blaKPC, blaTEM and blaCTX-M genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 658–665, 1 jul. 2016.

JEANNOT, Katy; BOLARD, Arnaud; PLÉSIAT, Patrick. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 5, p. 526–535, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857917300328>>.

Acesso em: 9 nov. 2022.

KANTIANI, Lina; FARRÉ, Marinella; SIBUM, Martin; *et al.* Fully automated analysis of beta-lactams in bovine milk by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 11, p. 4285–4295, 2009.

KATONGOLE, Paul; NALUBEGA, Fatuma; FLORENCE, Najjuka Christine; *et al.* Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical isolates in Uganda. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 453, 2020. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-020-05186-1>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

KOBS, Vanessa C.; VALDEZ, Rafael E.; MEDEIROS, Francielle de; *et al.* mcr-1-carrying *Enterobacteriaceae* isolated from companion animals in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 9, p. 690–695, 2020. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2020000900690&tlng=en>. Acesso em: 9 nov. 2022.

KÜREKCI, Cemil; OSEK, Jacek; AYDIN, Muhsin; *et al.* Evaluation of bulk tank raw milk and raw chicken meat samples as source of ESBL producing *ESCHERICHIA COLI* in Turkey: Recent insights. **Journal of Food Safety**, v. 39, n. 2, p. e12605, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfs.12605>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

LAMBRECHT, Ellen; VAN COILLIE, Els; VAN MEERVENNE, Eva; *et al.* Commensal *E. coli* rapidly transfer antibiotic resistance genes to human intestinal microbiota in the Mucosal Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (M-SHIME). **International Journal of Food Microbiology**, v. 311, p. 108357, 2019.

LIMA, A. V. A. *et al.* Occurrence and Diversity of Intra- and Interhospital Drug-Resistant and Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Drug Resistance**, p.mdr.2019.0214, 2020.

LIMA, Hevana S.; MARIZ, Daniele; COSTA, Bruna M. Da Silva; *et al.* Adaptation of Crested Caracaras (*Caracara plancus*) to Urban Environments: First Report of a Nest Made of Human-Made Materials. *Journal of Raptor Research*, v. 56, n. 3, p. 365–370, 2022. Disponível em: <<https://bioone.org/journals/journal-of-raptor-research/volume-56/issue-3/JRR-22-07/Adaptation-of-Crested-Caracaras-Caracara-plancus-to-Urban-Environments/10.3356/JRR-22-07.full>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

LIMA, Lidia Moreira; SILVA, Bianca Nascimento Monteiro da; BARBOSA, Gisele; *et al.* β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 208, p. 112829, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523420308011>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

LIU, Huimin; MENG, Lu; DONG, Lei; *et al.* Prevalence, Antimicrobial Susceptibility, and Molecular Characterization of *Escherichia coli* Isolated From Raw Milk in Dairy Herds in Northern China. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 730656, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.730656/full>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

MACHALABA, Catherine; RAUFMAN, Jill; ANYAMBA, Assaf; et al. Applying a One Health Approach in Global Health and Medicine: Enhancing Involvement of Medical Schools and Global Health Centers. **Annals of Global Health**, v. 87, n. 1, p. 30, 2021. Disponível em: <<http://www.annalsofglobalhealth.org/article/10.5334/aogh.2647/>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

MACKENZIE, John S.; JEGGO, Martyn. The One Health Approach—Why Is It So
MARTIN, Nathaniel I.; HU, Haijing; MOAKE, Matthew M.; et al. Isolation, Structural Characterization, and Properties of Mattacin (Polymyxin M), a Cyclic Peptide Antibiotic Produced by *Paenibacillus kobensis* M. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 15, p. 13124–13132, 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819646909>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

MELO, Ana Beatriz Fabrício; et al. Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in the Central-Western Region, Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 6, p. 1–4, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716516300212>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

MEZGHANI MAALEJ, S.; REKIK MEZIOU, M.; MAHJOUBI, F.; et al. Epidemiological study of *Enterobacteriaceae* resistance to colistin in Sfax (Tunisia). **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 42, n. 6, p. 256–263, 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0399077X12000923>>. Acesso em: 9 nov. 2022.
microorganisms in a university hospital from Vitória (ES), Brazil. *Jornal Brasileiro de*

MILLER, Amanda K.; BRANNON, Mark K.; STEVENS, Laurel; et al. PhoQ Mutations Promote Lipid A Modification and Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Found in Colistin-Treated Cystic Fibrosis Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5761–5769, 2011. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.05391-11>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

NGAIGANAM, Edgarthe Priscilla; PAGNIER, Isabelle; CHAALAL, Wafaa; et al. Investigation of urban birds as source of β -lactamase-producing Gram-negative bacteria in Marseille city, France. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 61, n. 1, p. 51, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13028-019-0486-9>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

NÚÑEZ-SAMUDIO, Virginia; PECCHIO, Maydelin; PIMENTEL-PERALTA, Gumerindo; et al. Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Clinical Isolates from Central Panama. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 899, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6382/10/8/899>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

OLIVEIRA, Plínio Aguiar; RUAS, Jerônimo Lopes; SANTOS, Luciana Siqueira; et al. CHEWING LICE (*Phthiraptera*) FROM CRESTED CARACARA (*Caracara plancus*, *Falconidae*) IN SOUTHERN BRAZIL. **Science And Animal Health**, v. 7, n. 3, p. 172–179, 2019. Disponível em: <<https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/veterinaria/article/view/16384>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

OVERGAAUW, Paul A. M.; VINKE, Claudia M.; VAN HAGEN, Marjan A. E.; *et al.* A One Health Perspective on the Human–Companion Animal Relationship with Emphasis on Zoonotic Aspects. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 11, p. 3789, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-4601/17/11/3789>>. Acesso em: 4 dez. 2022.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804–1813, 13 maio 2010.

PETERSON, Elizabeth; KAUR, Parjit. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2928, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02928/full>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

PITOUT, Johann D. D. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00009/abstract>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

PITOUT, Johann D. D.; PEIRANO, Gisele; KOCK, Marleen M.; *et al.* The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, p. e00102-19, 2019. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00102-19>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

POIREL, Laurent; JAYOL, Aurélie; NORDMANN, Patrice. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 557–596, 2017. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00064-16>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

RAEISPOUR, Maryam; RANJBAR, Reza. Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 118, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13756-018-0411-4>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

REZAI, Mohammad Sadegh; SALEHIFAR, Ebrahim; RAFIEI, Alireza; *et al.* Characterization of Multidrug Resistant Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* among Uropathogens of Pediatrics in North of Iran. **BioMed Research International**, v. 2015, p. e309478, 2015. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/309478/>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

RIBEIRO, M. G.; MOTTA, R. G.; PAES, A. C.; *et al.* Peracute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 485–488, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/abmvz/a/GCXYVFJ3gp8j8KKvwhLs8WP/?lang=en>>. Acesso em: 2 dez. 2022.

ROBERTS, Kade D.; AZAD, Mohammad A. K.; WANG, Jiping; *et al.* Antimicrobial Activity and Toxicity of the Major Lipopeptide Components of Polymyxin B and Colistin: Last-Line Antibiotics against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. **ACS Infectious Diseases**, v. 1, n. 11, p. 568–575, 2015. Disponível em:

<<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.5b00085>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

ROCHA, Igor Vasconcelos; DOS SANTOS SILVA, Natally; DAS NEVES ANDRADE, Carlos Alberto; *et al.* Diverse and emerging molecular mechanisms award polymyxins resistance to Enterobacteriaceae clinical isolates from a tertiary hospital of Recife, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, p. 104584, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134820304159>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

ROSSI, Flavia; GIRARDELLO, Raquel; MORAIS, Carlos; *et al.* Plasmid-mediated mcr-1 in carbapenem-susceptible Escherichia coli ST156 causing a blood infection: an unnoticeable spread of colistin resistance in Brazil? **Clinics**, v. 72, p. 642–644, 2017. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/clin/a/MqL9f4MwcPGbPgTqkMrQLhp/?lang=en>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

SANDOE, Peter; PALMER, Clare; CORR, Sandra; *et al.* Canine and feline obesity: a One Health perspective. **Veterinary Record**, v. 175, n. 24, p. 610–616, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1136/vr.g7521>>. Acesso em: 4 dez. 2022.

SAUER, Karin; STOODLEY, Paul; GOERES, Darla M.; *et al.* The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608–620, 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-022-00767-0>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

SERRA-BURRIEL, Miquel; KEYS, Matthew; CAMPILLO-ARTERO, Carlos; *et al.* Impact of multi-drug resistant bacteria on economic and clinical outcomes of healthcare-associated infections in adults: Systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 15, n. 1, p. e0227139, 2020. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0227139>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

SHAIKH, Sibghatulla; FATIMA, Jamale; SHAKIL, Shazi; *et al.* Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 1, p. 90–101, 2015. (Special issue: Biological Aspects of Global Health Issues). Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X14000941>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

SILVA, Ewerton Fylype de Araújo; BARROS, Joanna Francyne Silva de; FRAGA, Kleber Botelho; *et al.* Cloacal enterobacteria isolated from captive roadside hawks (*Rupornis magnirostris*, GMELIN, 1788) and their antimicrobial susceptibility profile. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 207–213, 2016. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/98842>>. Acesso em: 5 dez. 2022.

SILVA, Fernanda Alda da; MEDEIROS, Sandrelli Meridiana de Fátima Ramos dos Santos; COSTA-JUNIOR, Sérgio Dias da; *et al.* Antimicrobial Resistance Profile and Biofilm Production of Microorganisms Isolated from Oropharynx of *Rupornis magnirostris* (Gmelin, 1788) and *Caracara plancus* (Miller, 1777). **Veterinary Medicine International**, v. 2020, p. e8888618, 2020. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/vmi/2020/8888618/>>. Acesso em: 5 dez. 2022.

SILVA, Gedeon Galdino da Cruz; CAMPANA, Eloiza Helena; VASCONCELOS, Priscylla Carvalho; *et al.* Occurrence of KPC-Producing *Escherichia coli* in Psittaciformes Rescued from Trafficking in Paraíba, Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 1, p. 95, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-4601/18/1/95>>. Acesso em: 5 dez. 2022.

SONCINI, João Gabriel Material; CERDEIRA, Louise; SANO, Elder; *et al.* Genomic insights of high-risk clones of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from community infections and commercial meat in southern Brazil. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 9354, 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-022-13197-y>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

SUBRAMANIAN, Pramodhini; SHANMUGAM, Niveditha; SIVARAMAN, Umadevi; *et al.* Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. **The Australasian Medical Journal**, v. 5, n. 7, p. 344–348, 2012.

TAYLOR, L. H.; LATHAM, S. M.; WOOLHOUSE, M. E. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 356, n. 1411, p. 983–989, 2001.

TIEMTORÉ, Rahimatou Yasmine Wendkuni; MÈTUOR DABIRÉ, Amana; OUERMI, Djénéba; *et al.* Isolation and Identification of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains Resistant to the Oxyimino-Cephalosporins and the Monobactam by Production of GES Type Extended Spectrum Bêta-Lactamase (ESBL) at Saint Camille Hospital Center in Ouagadougou, Burkina Faso. **Infection and Drug Resistance**, v. 15, p. 3191–3204, 2022.

TOOKE, Catherine L.; HINCHLIFFE, Philip; BRAGGINTON, Eilis C.; *et al.* β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p. 3472–3500, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6723624/>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

TRIMBLE, Michael J.; MLYNÁRČIK, Patrik; KOLÁŘ, Milan; *et al.* Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 6, n. 10, p. a025288, 2016. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a025288>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

VELKOV, Tony; ROBERTS, Kade D; NATION, Roger L; *et al.* Pharmacology of polymyxins: new insights into an ‘old’ class of antibiotics. **Future Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 711–724, 2013. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.13.39>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

VELKOV, Tony; THOMPSON, Philip E.; NATION, Roger L.; *et al.* Structure–Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1898–1916, 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm900999h>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

VIDAL, Ana M. C.; SARAN NETTO, Arlindo; VAZ, Andreia C. N.; *et al.* *Pseudomonas* spp.: contamination sources in bulk tanks of dairy farms. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 941–948, 2017. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/j/pvb/a/mfJdsGMKkQ97c3nV4Jn8VjS/?lang=en>>. Acesso em: 4 dez. 2022.

VIGLIOTTA, Giovanni; GIORDANO, Deborah; VERDINO, Anna; *et al.* New compounds for a good old class: Synthesis of two B-lactam bearing cephalosporins and their evaluation with a multidisciplinary approach. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 115302, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096808961931363X>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

VINEIS, Paolo; PERERA, Frederica. Molecular epidemiology and biomarkers in etiologic cancer research: the new in light of the old. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 16, n. 10, p. 1954–1965, 2007.

WEBER, Mareike; LIEDTKE, Janine; PLATTES, Susanne; *et al.* Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and –independent methods. **PLOS ONE**, v. 14, n. 9, p. e0222238, 2019. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0222238>>. Acesso em: 4 dez. 2022.

WELLS, Deborah L. The State of Research on Human–Animal Relations: Implications for Human Health. **Anthrozoös**, v. 32, n. 2, p. 169–181, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/08927936.2019.1569902>>. Acesso em: 4 dez. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. **WHO**, Geneva, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12>. Acesso em: 14 nov. 2021.

XU, Yongchang; WEI, Wenhui; LEI, Sheng; *et al.* An Evolutionarily Conserved Mechanism for Intrinsic and Transferable Polymyxin Resistance. **mBio**, v. 9, n. 2, p. e02317-17, 2018. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.02317-17>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

YANG, Xiaowei; GUO, Runsheng; XIE, Banglin; *et al.* Drug resistance of pathogens causing nosocomial infection in orthopedics from 2012 to 2017: a 6-year retrospective study. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 16, n. 1, p. 100, 2021. Disponível em: <<https://josr-online.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13018-021-02234-7>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

YANG, Yong-Qiang; LI, Yun-Xia; LEI, Chang-Wei; *et al.* Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1791–1795, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article/73/7/1791/4975457>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

ZHANG, Fusheng; CHENG, Wei. The Mechanism of Bacterial Resistance and Potential Bacteriostatic Strategies. **Antibiotics**, v. 11, n. 9, p. 1215, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6382/11/9/1215>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

ZHEBRUN, A. B. [From molecular to genomic and metagenomic epidemiology]. **Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii I Immunobiologii**, n. 3, p. 91–100, 2014.

ZIÓŁKOWSKI, Grzegorz; PAWŁOWSKA, Iwona; STASIOWSKI, Michał; et al. Multidrug-Resistant Micro-Organisms Associated with Urinary Tract Infections in Orthopedic Patients: A Retrospective Laboratory-Based Study. **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 7, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6382/10/1/7>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

APÊNDICE A – ARTIGO 1 PUBLICADO

Dissemination and prevalence of polymyxin-resistant bacteria of clinical and environmental origin

Disseminação e prevalência de bactérias resistentes à polimixina de origem clínica e ambiental

Diseminación y prevalencia de bacterias resistentes a la polimixina de origen clínico y ambiental

Received: 09/06/2022 | Revised: 09/21/2022 | Accepted: 09/22/2022 | Published: 09/29/2022

Sérgio Dias da Costa Júnior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2501-3284>

Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

E-mail: sergio.dcosta@ufpe.br

Luís André de Almeida Campos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9849-922X>

Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

E-mail: luis.andre@ufpe.br

Iago Dillion Lima Cavalcanti

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6625-8395>

Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

E-mail: iago.dillion@ufpe.br

Jainaldo Alves da Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1308-9329>

Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

E-mail: jainaldo.costa@ufpe.br

Gustavo Ramos Salles Ferreira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8170-8745>

Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

E-mail: gustavo.salles@ufpe.br

Jaqueline dos Santos Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5189-592X>

Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

E-mail: jaqueline.jss@ufpe.br

Sivoneide Maria da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6507-2609>

Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

E-mail: sivoneide.maria@ufpe.br

Maria Betânia Melo de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5188-3243>

Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

E-mail: maria.bmoliveira@ufpe.br

Abstract

Polymyxins were discovered in the 1940s and were used to treat infections caused by gram-negative bacteria. These molecules act by destroying the cell membrane through the destabilization of phospholipids and lipopolysaccharides (LPS). Due to adverse effects, such as nephrotoxicity and neurotoxicity, this class had seen limited use. However, with the evolution of antimicrobial resistance to commercial drugs, the use of polymyxins has resumed, and over time, strains resistant to this drug have been observed. Currently, resistant bacteria this antimicrobial are found in hospital environments, and non-anthropized environments. This occurrence constitutes a global human and environmental health problem that is of concern to the population, health professionals, and researchers. Thus, this review was conducted with the objective of describing the mechanisms and the occurrence of bacterial resistance to polymyxins, and to demonstrate the relationship between multi-resistant strains of clinical and environmental origins.

Keywords: *Bacillus polymyxa*; Colistin; Bacterial resistance; Public health.

Resumo

As polimixinas foram descobertas na década de 1940 e eram usadas para tratar infecções causadas por bactérias gram-negativas. Essas moléculas atuam destruindo a membrana celular através da desestabilização de fosfolípidios e lipopolissacarídeos (LPS). Devido a efeitos adversos, como nefrotoxicidade e neurotoxicidade, essa classe teve o uso limitado. No entanto, com a evolução da resistência antimicrobiana aos medicamentos comerciais, o uso de polimixinas foi retomado e, com o passar do tempo, foram observadas cepas resistentes a esses medicamentos. Atualmente, bactérias resistentes a estes antimicrobianos, são encontradas em ambientes hospitalares e não antropizados. Essa ocorrência constitui um problema global de saúde humana e ambiental que preocupa a população,

profissionais de saúde e pesquisadores. Assim, esta revisão foi realizada com o objetivo de descrever os mecanismos e a ocorrência de resistência bacteriana às polimixinas, e demonstrar a relação entre cepas multirresistentes de origem clínica e ambiental.

Palavras-chave: *Bacillus polymyxa*; Colistina; Resistência bacteriana; Saúde pública.

Resumen

Las polimixinas se descubrieron en la década de 1940 y se usaron para tratar infecciones causadas por bacterias gramnegativas. Estas moléculas actúan destruyendo la membrana celular mediante la desestabilización de los fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS). Debido a los efectos adversos, como la nefrotoxicidad y la neurotoxicidad, esta clase ha tenido un uso limitado. Sin embargo, con la evolución de la resistencia antimicrobiana a los fármacos comerciales, se ha retomado el uso de polimixinas y con el tiempo se han observado cepas resistentes a este fármaco. Actualmente, las bacterias resistentes a este antimicrobiano se encuentran en ambientes hospitalarios y ambientes no antropizados. Este hecho constituye un problema mundial de salud humana y ambiental que preocupa a la población, profesionales de la salud e investigadores. Por lo tanto, esta revisión se realizó con el objetivo de describir los mecanismos y la aparición de resistencia bacteriana a las polimixinas, y demostrar la relación entre cepas multirresistentes de origen clínico y ambiental.

Palabras clave: *Bacillus polymyxa*; Colistina; Resistencia bacteriana; Salud pública.

1. Introduction

Polymyxins are antibiotics isolated from the microorganism *Paenibacillus polymyxa* (formerly known as *Bacillus polymyxa*). These drugs were introduced in clinical practice to treat infections caused by gram-negative bacteria in the 1950s. However, their use declined in the 1970s due to limitations such as nephrotoxicity and neurotoxicity, low permeability and absorption in the gastrointestinal tract (Dubashynskaya & Skorik, 2020; Li et al., 2019).

These antibiotics are polypeptides that chemically differ that exert bactericidal activity by disrupting the cell membrane through electrostatic and hydrophobic interactions (Zavascki et al., 2007). These drugs have a molecular weight of ~1200 Da and are characterized by the presence of a polycationic peptide ring with a peptide attached to a fatty acid tail (Kaye et al., 2016). Their action happens on gram-negative bacteria, since they destabilize phospholipids and lipopolysaccharides (LPS), the main components of the outer membrane of these microorganisms (Yu et al., 2015). Among the five existing polymyxins, only polymyxin B and polymyxin E have clinical applications (Dubashynskaya & Skorik, 2020; Trimble et al., 2016).

Because of the antibiotic resistance worldwide, these drugs have become the last therapeutic resource, especially, against multidrug-resistant gram-negative bacilli such as *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacteriaceae* carbapenem-resistant (Baron et al., 2016; Zakuan & Suresh, 2018). As resistance to less toxic antibiotics increased, the use of polymyxins became more frequent (Li et al., 2019).

Because of the limited number of agents available to treat infections caused by these bacteria, the emergence of resistance to polymyxins is a major concern. The main mechanism of resistance to these drugs involves the modification of LPS of the bacterial outer membrane, which reduces the net negative charge or fluidity of the LPS, increases the efflux of the drug, blocks the porin pathway, and enhances capsule formation and hypervesiculation (Trimble et al., 2016; Giamarellou, 2016).

The intensive use of polymyxins in the treatment of infections in humans and in agriculture influences the evolution of resistance to this drug, which varies in different parts of the world, according to environment and geographical location (Falagas et al., 2010; Srinivas & Rivard, 2017). The global rates of resistance to polymyxin are presented in different percentages ranging, for example, from 0.4% to 4.8% in *A. baumannii*, 0.1% to 0.6% in *P. aeruginosa*, and 1.3% to 1.8% in *Enterobacteriaceae* (Bradford et al., 2016; Sader et al., 2014).

Resistance to this drug has been reported in microorganisms of hospital and environmental origin, since Antibiotic Resistance Genes (ARGs) can be transferred between species of both origins. The dissemination of ARGs occurs via

Horizontal Gene Transfer (HGT), which is, through mobile genetic elements. The investigation of bacterial transmission pathways between the clinical environment and the extra-hospital environment contributes to controlling the spread of multiresistant pathogens (Lerminiaux & Cameron, 2019).

In this context, different environments can be places of emergence and dissemination of bacteria resistant to polymyxins (Martins et al., 2014). Thus, this review aimed to present the main mechanisms of bacterial resistance to polymyxins, as well as to correlate the resistance in strains of clinical and environmental origin.

2. Methodology

The present study is an integrative literature review that used articles published in the main academic databases: PubMed, Web of Science, Google Scholar, Science Direct and Mendeley. The survey was conducted between February and March 2020 with no restrictions on languages and years of publication. For the selection of articles relevant to the topic of this review, studies that met the following inclusion criteria (descriptors) were considered: Polymyxins, polymyxin B, colistin, polymyxin resistance, polymyxin-resistant hospital bacteria, polymyxin-resistant bacteria in the environment and mcr genes.

3. Polymyxins

These antibiotics were discovered in the 1940s and introduced into clinical practice in the late 1950s. Of the five types described (A to E), only two (B and E) were used in clinical practice (Ezadi et al., 2019; Moubareck, 2020). Polymyxin B was originally isolated from *B. polymyxa* in 1947, while polymyxin E (colistin) was isolated from *B. polymyxa* var. *colistinus* in 1949, being the most used in the world (Ortwine, 2015). Until the mid-1970s, these drugs were widely used, causing adverse events, mainly at the renal and neurological (Mendes & Burdmann, 2009; Nation et al., 2019; Rabanal & Cajal, 2017; Poirel et al., 2017).

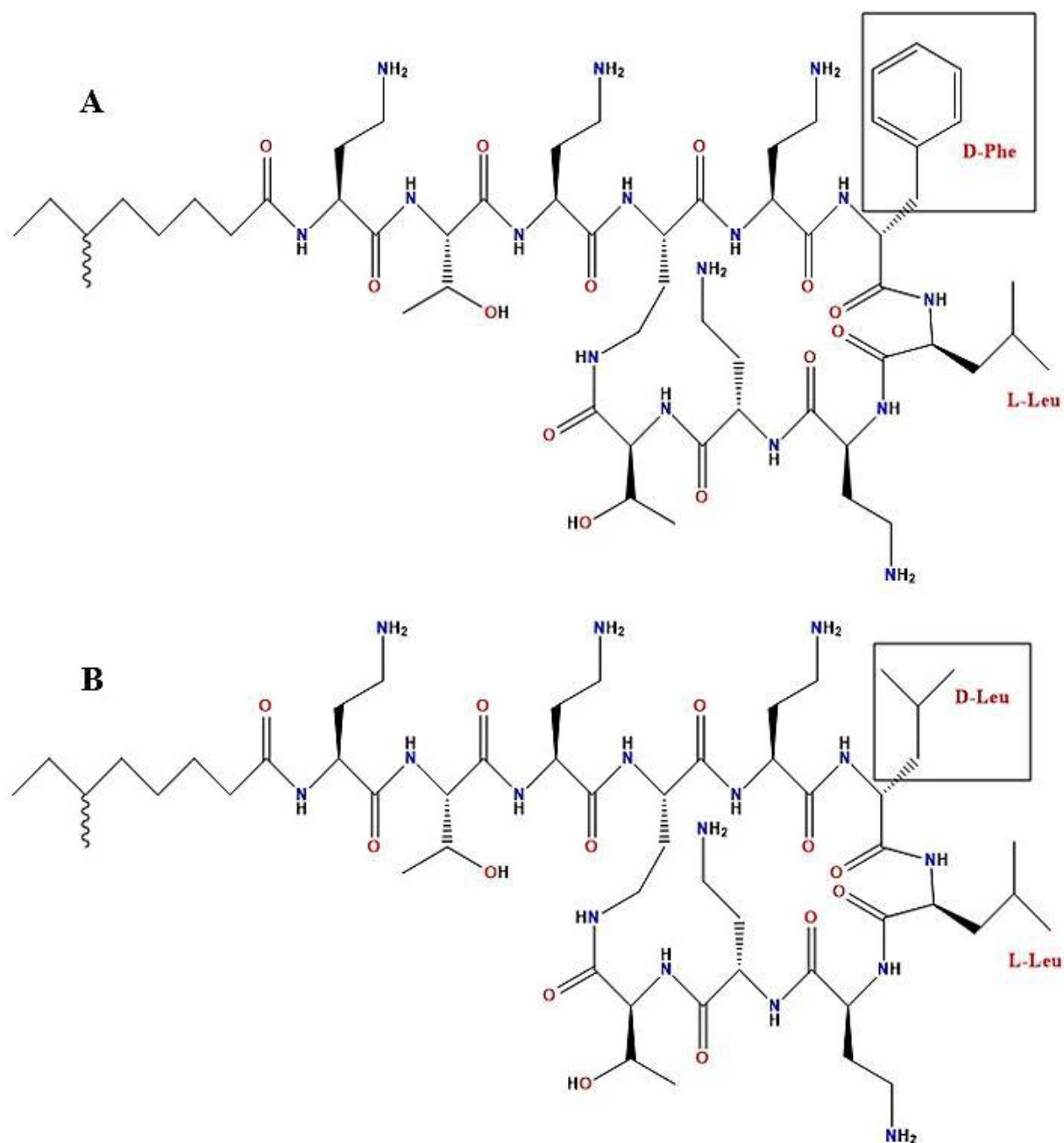
Due to their high toxicity, the use of polymyxins in clinical practice has been discontinued. This was made possible by the introduction of antibiotics with a lower toxicity index, such as third-generation cephalosporins and later carbapenems (Fair & Tor, 2014; Vaara, 2019). However, with the increase in Multidrug-Resistant (MDR) bacteria in the late 20th century and the absence of effective antimicrobials to treat infections caused by these microorganisms, previously discontinued antimicrobials, such as polymyxins B and E, were reconsidered as treatment options (Poirel et al., 2017; Ahmed et al., 2020; Garg et al., 2017).

With the resumption of the use of polymyxins, it is necessary to study the pharmacological characteristics of these drugs, including their pharmacodynamic, pharmacokinetic, and toxicity profiles, to auxiliary the development strategies of minimize adverse effects (Mendes & Burdmann, 2009; Nation et al., 2019; Falagas & Kasiakou, 2006; Tran et al., 2016).

3.1 Chemical structure of polymyxins

Polymyxins B and E are cyclic polycationic polycyclic decapeptide antimicrobials derived from the products of the *P. polymyxa*, which exhibit potent activity against most species of gram-negative bacteria (Moubareck, 2020; Rabanal & Cajal, 2017; Jeong et al., 2019). Structurally, they are cationic polypeptides formed by a heptapeptide ring attached to an acylated fatty acid chain at the N-terminal end. They differ in their chemical structures by the presence of a D-phenylalanine (in polymyxin B) or a D-leucine (in colistin) at carbon 6 (Figure 1) (Yu et al, 2015; Gallardo-Godoy et al., 2019; Gallardo-Godoy et al., 2016).

Figure 1. Chemical structure of the two antibiotics that make up the polymyxins class.



In (A) polymyxin B and (B) colistin, composed of a decapeptide core that contains an intramolecular cycle of heptapeptides linked by amide bonds between the amino group of the side chain of the diaminobutyric acid residue (Dab) in the position 4 and the carboxyl group on the terminal C-threonine residues. Source: Authors

Polymyxin B has the molecular formula $C_{56}H_{98}N_{16}O_{13}$, with a molecular weight of 1203.5 g/mol, melting point $>203^{\circ}\text{C}$ and solubility in water of 0.0744 mg/mL. This antibiotic is indicated for the treatment of meningitis, urinary tract infections, and bloodstream. While Polymyxin E has a molecular formula of $C_{52}H_{98}N_{16}O_{13}$, with a molecular weight of 1155.4 g/mol, melting point of $200\text{--}220^{\circ}\text{C}$, solubility in water of 0.238 mg/mL, and is indicated for the treatment of chronic lung infections (Ngamprasertchai et al., 2018; PubChem, 2022; PubChem, 2022).

3.2 Pharmacodynamics and pharmacokinetics

The pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles that best describe the action of polymyxins are concerned with the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), which is dependent on the concentration of the antimicrobial and the time of exposure (Bergen et al., 2012; Kuti, 2016; Sumi et al., 2019). Thus, the concentration of the antimicrobial should be higher if the bacteria show a higher level of resistance. Colistin is a prodrug used in the form of Colistimethate Sodium (CMS), which after being metabolized is converted to colistin, while polymyxin B is used in the form of sulfated salt. Therefore, despite being similar in spectrum of action, these drugs have different pharmacokinetic profiles (Bialvaei & Kafil, 2015; Wenzler et al., 2016; Qi et al., 2020; Wallace et al., 2010).

Polymyxin B, when administered in active form, quickly reaches its peak plasma concentration. But colistin can take up to 8 h to reach the maximum concentration after the administration of CMS, which is converted to colistin in the renal tubules. This leads to high individual variation in CMS metabolism, especially in individuals with kidney disease (Tran et al., 2016; Couet et al., 2011; Nation et al., 2014). As a result, patients with reduced renal clearance eliminate CMS less efficiently, requiring dose adjustment. Polymyxin B, however, is excreted by other metabolic pathways, thus not requiring dose adjustment even with varying levels of creatinine clearance (Pogue et al., 2017; Zavascki & Nation, 2017).

The conversion rate of CMS to colistin is low, estimated at 30% (Couet et al., 2011; Pacheco et al., 2019). One of the advantages of using CMS is that most of the prodrug is eliminated in the urine, and a large part of the newly formed colistin accumulates in the urinary tract, which is advantageous in the treatment of urinary tract infections. This is unlike polymyxin B, in which only a small percentage is eliminated in the urine (Sorlí et al., 2019; Kassamali et al., 2014; Luque et al., 2017).

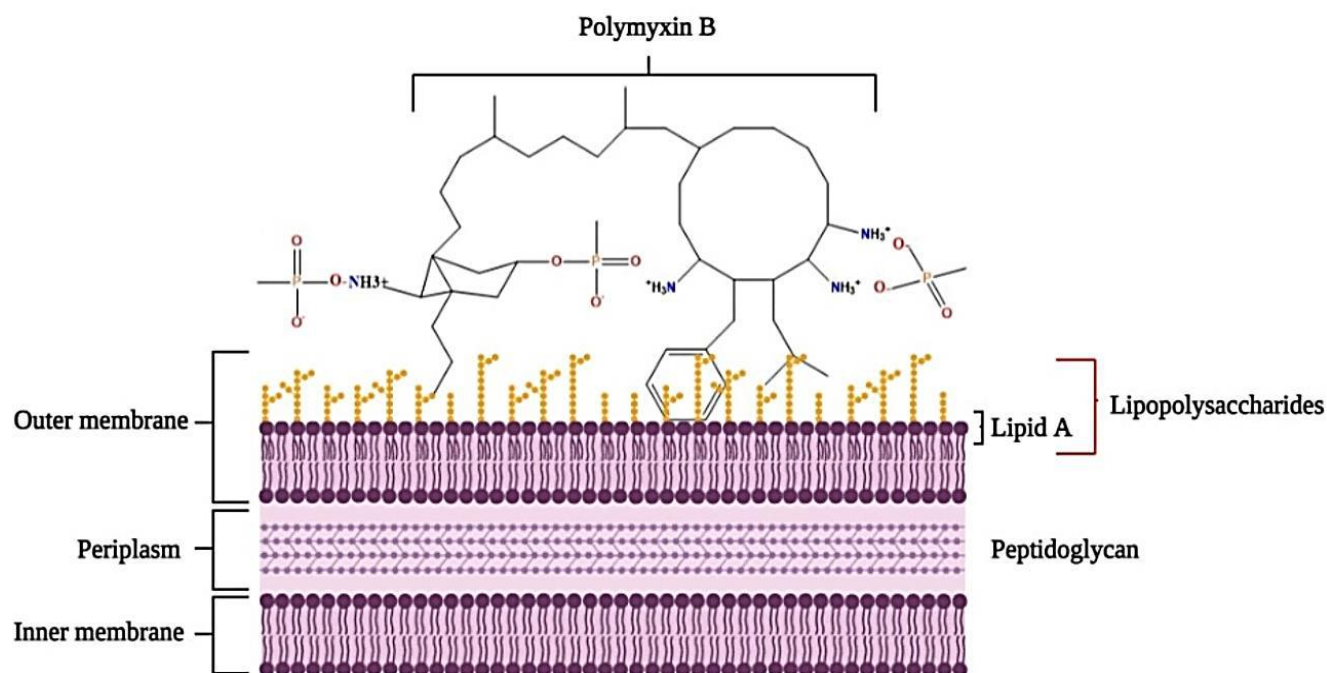
3.3 Mechanism of action and antimicrobial spectrum

The polymyxins at $<2 \mu\text{g/mL}$ concentration show excellent activity against several glucose-fermenting and non-fermenting gram-negative bacilli, including *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *P. aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp., including strains resistant to other classes of antibiotics (Moubareck, 2020; Poirel et al., 2017; Aghapour et al., 2019). The mechanisms of action of these drugs depend on their affinity to LPS, which contribute to the structural integrity of the bacterium and protect its membrane from certain types of chemical attacks, to which the outer membrane of gram-negative bacilli is vulnerable (Yu et al., 2015; Trimble et al., 2016; Telhig et al., 2020).

The positively charged polymyxin molecule interacts with the negatively charged phosphate groups in the lipid A portion of the LPS (Figure 2) (Velkov et al., 2010; Velkov et al., 2013). The insertion of the fatty acid chain and D-Phe-L-Leu (polymyxin B) or D-Leu-L-Leu (colistin), which are hydrophobic domains, destabilize the lipid A fatty acid chain, leading to distention of the single layer of the outer membrane. As a result of this destabilization, the polymyxin molecule can insert its hydrophobic regions in the outer membrane, causing membrane rupture and facilitating the additional uptake of polymyxins by the microorganism. Thus, result in disintegration of the bacterial cell (Moubareck, 2020; Mohamed et al., 2016).

Deris et al., (2014) propose a new secondary mechanism of action of polymyxins, where these drugs act by inhibiting flavoenzyme NDH-2 (menaquinone dehydrogenase type II). This enzyme has plays an essential role in the transport of electrons through bacteria, thereby causing cell death. The authors also demonstrated in their study that polymyxin B has a greater potential for inhibiting NDH-2, when compared to colistin.

Figure 2. Interaction of polymyxin B in the membrane of Gram-negative bacteria.



Polymyxins work by binding to lipopolysaccharide (LPS) and phospholipid molecules present in the outer membrane of gram-negative bacteria. This process results in a change in the bacterial cell wall, leading to extravasation of intracellular content and, consequently, to the death of the bacteria. Source: Created with BioRender.com.

4. Mechanisms of Resistance to Polymyxins

Polymyxins exhibit no activity against anaerobic and gram-positive bacteria, because these microorganisms lack the outer cell membrane that contains LPS. In addition, several gram-negative bacteria are intrinsically resistant to polymyxins, including *Burkholderia cepacia* complex, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* *Proteus* spp., and *Providencia* spp (Magiorakos et al., 2012). The natural resistance of these microorganisms to this class of antimicrobials is due to constitutive changes in gene expression, which result in the addition of cationic molecules in the outer membrane LPS. As a result, there is a decrease in the binding affinity of polymyxins at the site of action (Baron et al., 2016; Yahav et al., 2012).

The mechanisms of resistance to this drugs are not yet fully understood. So far, it is known that they can occur through mutation or adaptation mechanisms (Girardello & Gales, 2012; Lescat et al., 2018). Studies have found that two polymyxin resistance phenotypes are frequently observed. The first, called natural resistance, occurs through mutations in the bacterial genome and promotes MIC values close to those considered as resistance cutoff points for this class of antimicrobials. While the second is due to adaptive mechanisms of bacteria and occurs after exposure of bacterial strains to subinhibitory concentrations of the antimicrobial. In the case of the phenotype resulting from bacterial adaptation, MIC values may be higher, with MICs above 128 $\mu\text{g/mL}$ described in some studies (Srinivas & Rivard, 2017; Girardello & Gales, 2012).

The development of resistance to polymyxins because of the change in LPS was discovered through studies on strains of *Salmonella enterica*. It was observed that the addition of 4-amino-arabinose to the lipid A portion of LPS, one of the components of the external membrane of gram-negative bacteria, was associated with changes in the susceptibility to polymyxins in these microorganisms (Srinivas & Rivard, 2017).

In *P. aeruginosa*, the resistance to polymyxins involves a complex network of three systems (PmrAB, PhoPQ, and ParRS) with two components. The PhoPQ system is involved in the modification of LPS lipid A of gram-negative bacteria, and mutations in it lead to loss of function of the phoQ gene, resulting in high levels of resistance to polymyxins. In addition,

the PmrAB and PhoPQ systems promote changes in the expression of the operon responsible for the addition of 4-amino-arabinose to lipid A, causing alterations in the polymyxin susceptibility phenotype in strains of this species. While the two-component ParRS system is associated with the mechanism of adaptive resistance of *P. aeruginosa* strains to polymyxins (Baron et al., 2016; Girardello & Gales, 2012).

For *Acinetobacter* spp., the pmrCAB operon is associated with polymyxin resistance. The genes in this operon form a two-component system, in which pmrB functions as a histidine kinase sensor and pmrA is the response regulatory protein. This system controls the expression of the pmrC gene, which is responsible for adding phosphoethanolamine to LPS lipid A. The addition of phosphoethanolamine to lipid A reduces the negative charge on the bacterial surface and limits the interaction with polymyxins. In addition, mutations in the pmrB gene are associated with decreased susceptibility to polymyxins (Lescat et al., 2018; Mlynarcik & Kolar, 2019).

In other species such as *K. pneumoniae* strains, the activation of the PhoPQ system is associated with the alteration of the permeability properties of the outer membrane through stimulation of the expression of the *PagP* gene involved in lipid acylation. In *Legionella pneumophila* strains, the *rcp* gene has a *PagP*-like function, providing resistance to polymyxin B. In addition, missense mutations in the *CrrB* gene are associated with colistin resistance in *K. pneumoniae* isolates (Storey et al., 2020; Robey et al., 2001).

Studies indicate that resistance to polymyxins in some isolates of *Neisseria meningitidis* and *K. pneumoniae* due to increased production of capsular polysaccharides, which decreases the interaction of the drug with the bacterial surface. Thus, changes in the expression of genes involved in the regulation of polysaccharide capsule synthesis (*siaD*, *OmpA*, and the operon *cps*) may be associated with associated decreased susceptibility to polymyxins (Ahmed et al., 2020; Mlynarcik & Kolar, 2019).

According to an epidemiological surveillance study, an increase in colistin resistance was observed in *E. coli* strains isolated from animals. In further analysis, the researchers discovered a resistance mechanism that was transmissible between the strains, involving the plasmidial gene *mcr-1* (Liu et al., 2015). To date, seven different *mcr* genes and their variants have been described in the literature. The *mcr* gene encodes a phosphoethanolamine transferase involved in the modification of the LPS lipid A phosphate group (Srinivas & Rivard, 2017; Mlynarcik & Kolar, 2019; Moffatt et al., 2019).

The prevalence of strains resistant to polymyxins and the carriers of the *mcr-1* gene, varies between locations around the world. In addition, time is also a factor influencing the profile of bacterial resistance, especially in gram-negative bacteria, in which the conjugation process is capable of transferring genetic information between microorganisms of different species.

4.1 Antimicrobial resistance in strains of clinical origin

The increased use of therapeutic agents of last choice, such as colistin, has resulted in the emergence of new mechanisms in target pathogens in clinical settings. Some strains of *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, and species of the family *Enterobacteriaceae* Resistance to colistin (CoR) have already been identified in hospitalized patients (Sherry & Howden, 2018; Cannatelli et al., 2014; Lee et al., 2011). Since the first clinical CoR strain of *K. pneumoniae* was reported, species of the *Enterobacteriaceae* that carry the CoR spread globally (Antoniadou et al., 2007). Increased rate of colistin resistance in *K. pneumoniae* has been reported in several countries like Tunisia (from 3.57% in 2002 to 9.68% in 2013) and Romania (25.8%) (Battikh et al., 2017; Maalej et al., 2012). While the clinical CoR isolates of *A. baumannii* have also increased over the last few decades, polymyxin resistance rates are extremely variable between *A. baumannii* isolates across the world (Li et al., 2019).

In 2013, the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) collected annual data from 17 countries, showing high levels of CoR strains (>80%) in Greece and Italy (Giamarellou, 2016). While studies in other countries, such as Iran and Bulgaria, did not report the occurrence of CoR (Mahmoudi et al., 2017; Strateva et al., 2018). In case of *P. aeruginosa*, the rate of CoR has remained relatively low (0.3–1.4%) in comparison with other *Enterobacteriaceae*

and *A. baumannii*. The exception was a national surveillance study from China in 2013, where 22.2% of *P. aeruginosa* Extensively Drug-Resistant (XDR) isolates were resistant to polymyxin B (Sherry & Howden, 2018; Xu et al., 2016).

Some studies have shown that several factors, including polymyxin subtherapy, prolonged monotherapy, association with steroid and high colonization pressure, are directly linked to the rise resistance (Li et al., 2019; Ah et al., 2014; Papadimitriou-Olivgeris et al., 2014). Huang et al., (2020) showed that the resistance to colistin increased in *Enterobacteriaceae* isolates in China during the period 2014-2019, after the introduction of polymyxin in clinical use. Prim et al., (2017), showed that patients infected with *Enterobacteriaceae* CoR with a record of colistin administration, had more previous hospital admissions and comorbidities, and presented with hospital-acquired infections.

The main factor responsible for the mechanism of resistance to polymyxins are chromosomal mutations in several genes. For example, *MgrB* and *CrrB* gene, are directly involved in LPS modifications that prevent the interaction between the polymyxins and LPS; and also provide resistance to this antimicrobial agent (Gunn, 2008; Olaitan et al., 2014; Wright et al., 2015). Cannatelli et al., (2014), demonstrated the relationship between the inactivation of *MgrB* by mutations or insertion sequences, and polymyxin resistance in clinical *K. pneumoniae* isolates. Other chromosomal mutations included the alteration of the negative charge on LPS in the gram-negative bacteria cell wall. In the two-component systems (TCSs), *PhoPq* and *PmrAB*, are responsible for the addition of cationic groups to LPS. Mutations in these systems or their regulators result in their upregulation, such that more cationic groups are added to LPS, decreasing the negative charge, and thus preventing the action of colistin (Sirijatuphat & Thamlikitkul, 2014; Jeannot et al., 2017). This was observed in the study by Poirel et al., (2017) which detected mutations in *PmrAB* in clinical isolates of *K. pneumoniae* and *E. coli*.

In addition to chromosomal mutations, the emergence of the first plasmid-mediated mobile colistin resistance (*mcr*) gene, *mcr-1*, raised the alarm worldwide for the possibility of horizontal spread. This gene is responsible for the production of a phosphoethanolamine transferase that catalyzes the addition of cationic groups to LPS, as well as chromosomal mutations, thus decreasing the action and effect of colistin (Liu et al., 2015; Moffatt et al., 2019; Sherry & Howden, 2018). Despite being more common in environmental bacteria, *mcr-1* has been reported in *E. coli* isolates clinical origin, as well as *Salmonella* spp. and *K. pneumonia* (Prim et al., 2016; Shen et al., 2018; Lu et al., 2019; Strepis et al., 2021). The discovery of many other *mcr* genes, including *mcr-2* and *mcr-3*, and their presence being reported in many different plasmids, can provide new insights into horizontal and cross dissemination of colistin resistance between clinical isolates.

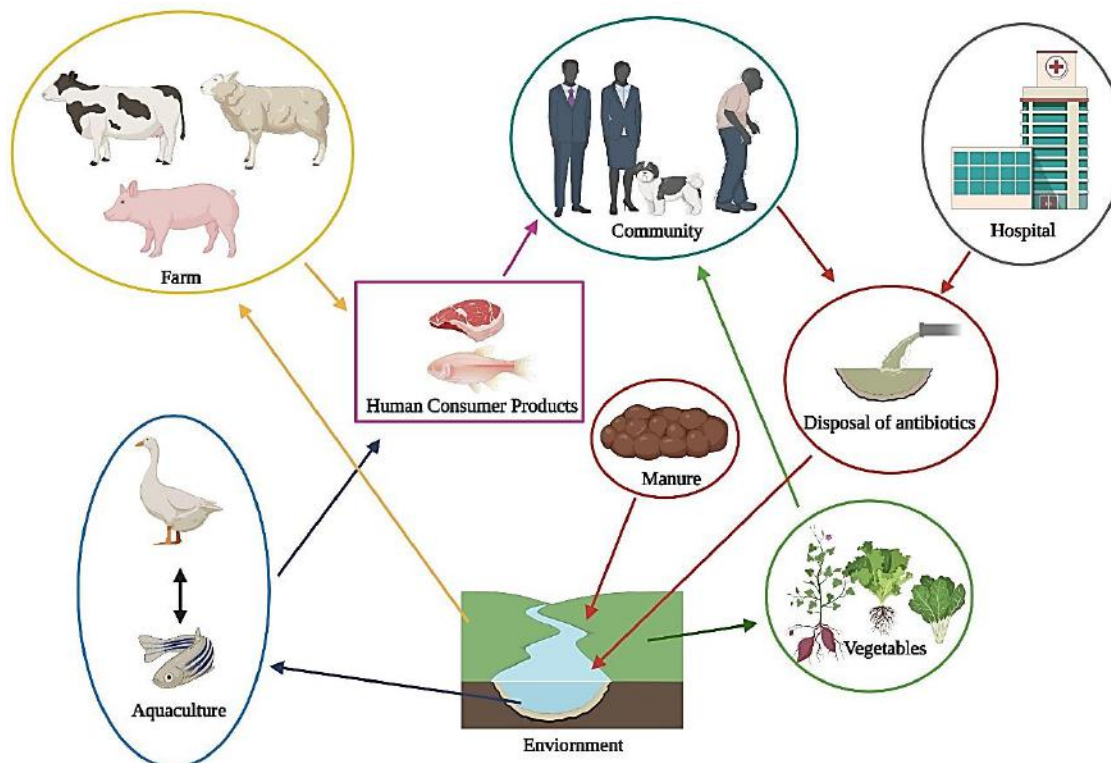
4.2 Bacterial resistance in strains of environmental origin

Bacterial resistance in the clinical environment is a public health problem that requires considerable attention. Bacteria resistant to antibiotics, especially to polymyxins, originating from the clinic, whether for humans or veterinary use, can easily spread to the environment (Balsalobre et al., 2014; Meirelles-Pereira et al., 2002). Unchanged bioactive forms of drugs can be excreted from human patients and enter the environment owing to the inefficiency of wastewater treatment. In addition, owing to their use in veterinary medicine, they are also present in animal excreta used as manure in agriculture (Figure 3) (Manyi-Loh et al., 2018; Serwecinska, 2020).

The environment has been shown to be a significant reservoir of ARGs. Frequently, ARGs are detected in cities, communities, farms, and natural environments (Xiaomin et al., 2020). Colistin resistance genes such as *mcr-1*, *mcr-2*, and *mcr-9* have been identified in recent years, and act by causing changes in lipid A in liposaccharide membranes (Carroll et al., 2019). Sun et al., (2018) showed the presence of these genes in pig manure through environmental samples, with a wide geographical distribution in Asian countries, in Australia, Europe, Africa, North America and South America. In other studies, it was observed rates of occurrence of positive isolates for *mcr-1* of 9.90% and 29.40%, in environmental samples collected from farms in China and Germany, respectively. This investigation showed that 25% and 100% of the samples were positive for

mcr-1, respectively, in these two countries (Guenther et al., 2017; Hille et al., 2018; Roschanski et al., 2017; Wang et al., 2018; Wang et al., 2018).

Figure 3. Cycle of transmission of antibiotic-resistant bacteria in the environment.



Representation of different ways of spreading resistant microorganisms between humans, animals and the environment, especially water sources, which are recipients of residual effluents. Source: Created with BioRender.com.

On farms, bacteria of the *Enterobacteriaceae* family carrying *mcr-1* are more frequent, such as, for example, *Providencia alcalifaciens*, *Raoultella planticola*, and *Enterobacter cloacae* (Wang et al., 2018). Bacterial conjugation assays showed that *mcr-1* could be transferred from *P. alcalifaciens* and *E. cloacae* to *E. coli*. This suggests that *mcr-1* can be naturally spread among species in this family and can be transferred from clinical to environmental isolates (Wang et al., 2018).

The agricultural environments are considered important for the storage and dissemination of *mcr-1*. The highest prevalence rates of *mcr-1* were observed in wastewater from hospitals and sewage treatment plants (Jin et al., 2018; Ovejero et al., 2017). The presence of *mcr-1* in different municipal wastewater treatment indicates that conventional sewage treatment processes cannot completely eliminate *mcr-1* (Hembach et al., 2017). Thus, isolates carrying this gene can further contaminate aquatic environments. The *mcr-1* has been detected not only in wastewater, but also in well water (Sun et al., 2018; Caltagirone et al., 2017), source water (Zhou et al., 2017), rivers (Zurfuh et al., 2016; Yang et al., 2017; Tuo et al., 2018), oceans and beaches in different countries as Algiers, Norway, China, and Switzerland (Drali et al., 2018; Jørgensen et al., 2017). Therefore, are necessary and urgent effective models or technologies to remove *mcr-1* from wastewater and also from other environments to prevent spread.

According to previous studies, it is evident that the *mcr-1* gene has prevalence in environments different. The data demonstrate the importance of understanding the destination of antimicrobials in the environment, since these sites can harbor and enable the emergence of resistant bacteria (Hurst et al., 2019; Menz et al., 2019), causing public health problems.

5. Conclusion

Studies have been conducted to identify strains with a profile of resistance to polymyxins in hospital, community, and non-anthropized environments. This indicates the emergence of global problems associated with the reduction in the effectiveness of antibiotics, especially this category used as a last therapeutic option, which results in an increase in extremely resistant bacterial pathogens. In this sense, approaches that seek to emphasize the mechanisms of gene transmission between pathogenic bacteria of clinical and environmental origin are essential. The present study contributes to alerting about the growing increase in microbial resistance to drugs routinely used in clinical practice, and how this resistance extends to other environments and can be disseminated in natural ecosystems.

References

- Aghapour, Z., Gholizadeh, P., Ganbarov, K., Bialvaei, A. Z., Mahmood, S. S., Tanomand, A., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., Yousefi, B., & Kafil, H. S. (2019). Molecular mechanisms related to colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Infect Drug Resist*, 12, 965-975.
- Ahmed, M. A. E. E., Zhong, L. L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., & Tian, G. B. (2020). Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerg Microbes Infect*, 9, 868-885.
- Ah, Y. M., Kim, A. J., & Lee, J. Y. (2014). Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*, 44, 8-15.
- Antoniadou, A., Kontopidou, F., Poulakou, G., Koratzanis, E., Galani, I., Papadomichelakis, E., Kopterides, P., Souli, M., Armaganidis, A., & Giamarellou, H. (2007). Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother*, 5, 786-790.
- Avedissian, S. N., Liu, J., Rhodes, N. J., Lee, A., Pais, G. M., Hauser, A. R., & Scheetz, M. H. A. (2019). review of the clinical pharmacokinetics of polymyxin B. *Antibiotics (Basel)*, 8, 31.
- Balsalobre, L. C., Dropa, M., & Matté, M. H. (2014). An overview of antimicrobial resistance and its public health significance. *Braz J Microbiol*, 45, 1-5.
- Baron, S., Hadjadj, L., Rolain, J. M., & Olaitan, A. O. (2016). Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents*, 48, 583-591.
- Battikh, H., Harchay, C., Dekhili, A., Khazar, K., Kechrid, F., Zribi, M., Masmoudi, A., & Fendri, C. (2017). Clonal Spread of Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Coproducing KPC and VIM Carbapenemases in Neonates at a Tunisian University Hospital. *Microb Drug Resist*, 2, 468-472.
- Bergen, P. J., Landersdorfer, C. B., Zhang, J., Zhao, M., Lee, H. J., Nation, R. L., & Li, J. (2012). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new? *Diagn Microbiol Infect Dis*, 74, 213-223.
- Bialvaei, A. Z., & Kafil, H. S. (2015). Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin*, 31, 707-721.
- Bradford, P. A., Kazmierczak, K. M., Biedenbach, D. J., Wise, M. G., Hackel, M., & Sahm, D. F. (2016). Correlation of β -lactamase production and colistin resistance among *Enterobacteriaceae* isolates from a global surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother*, 60, 1385-1392.
- Caltagirone, M., Nucleo, E., Spalla, M., Zara, F., Novazzi, F., Marchetti, V. M., Piazza, A., Bitar, I., De Cicco, M., Paolucci, S., Pilla, G., Migliavacca, R., & Pagani, L. (2017). Occurrence of extended spectrum β -lactamases, KPC-type, and MCR-1.2-producing *Enterobacteriaceae* from wells, river water, and wastewater treatment plants in Oltrepò Pavese area, Northern Italy. *Front Microbiol*, 8, 2232.
- Cannatelli, A., Giani, T., D'Andrea, M. M., Di Pilato, V., Arena, F., Conte, V., Tryfinopoulou, K., Vatopoulos, A., Rossolini, G. M., & COLGRIT Study Group. (2014). MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 5696-5703.
- Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldemann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M. (2019). Identification of novel mobilized colistin resistance gene mcr-9 in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate. *mBio*, 10, e00853-e00919.
- Couet, W., Grégoire, N., Gobin, P., Saulnier, P. J., Frasca, D., Marchand, S., & Mimoz, O. (2011). Pharmacokinetics of colistin and colistimethate sodium after a single 80-mg intravenous dose of CMS in young healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*, 89, 875-879.
- Deris, Z. Z., Akter, J., Sivanesan, S., Roberts, K. D., Thompson, P. E., Nation, R. L., Li, J., & Velkov, T. (2014). A secondary mode of action of polymyxin against gram negative involves the inhibition of NADPH-quinone reductase activity. *J Antibiot (Tokyo)*, 67, 147-151.
- Drali, R., Berrazeg, M., Zidouni, L. L., Hamitouche, F., Abbas, A. A., Deriet, A., & Mouffok, F. (2018). Emergence of mcr-1 plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from seawater. *Sci Total Environ*, 642, 90-94.
- Dubashynskaya, N. V., & Skorik, Y. A. (2020). Polymyxin delivery systems: Recent advances and challenges. *Pharmaceuticals*, 13, 83.
- Ezadi, F., Ardebili, A., & Mirnejad, R. (2019). Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: challenges, issues, and recommendations. *J Clin Microbiol*, 57, e01390-e01418.
- Fair, R. J., & Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem*, 6, 25-64.

- Falagas, M. E., & Kasiakou, S. K. (2006). Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care*, 10, R27.
- Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., & Matthaïou, D. K. (2010). Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat*, 13, 132-138.
- Gallardo-Godoy, A., Hansford, K. A., Muldoon, C., Becker, B., Elliott, A. G., Huang, J. X., Pelingon, R., Butler, M. S., Blaskovich, M. A. T., & Cooper, M. A. (2019). Structure-function studies of polymyxin B lipononapeptides. *Molecules*, 24, 553.
- Gallardo-Godoy, A., Muldoon, C., Becker, B., Elliott, A. G., Lash, L. H., Huang, J. X., Butler, M. S., Pelingon, R., Kavanagh, A. M., Ramu, S., Phetsang, W., Blaskovich, M. A., & Cooper, M. A. (2016). Activity and predicted nephrotoxicity of synthetic antibiotics based on polymyxin B. *J Med Chem*, 59, 1068-1077.
- Garg, S. K., Singh, O., Juneja, D., Tyagi, N., Khurana, A. S., Qamra, A., Motlekar, S., & Barkate, H. (2017). Resurgence of polymyxin B for MDR/XDR gram-negative infections: an overview of current evidence. *Crit Care Res Pract*, 3635609.
- Giamarellou, H. (2016). Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. *Int J Antimicrob Agents*, 48, 614-621.
- Girardello, R., & Gales, A. C. (2012). Resistência às Polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. *Rev Epidemiol Controle de Infec*, 2, 66.
- Guenther, S., Falgenhauer, L., Semmler, T., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., Roesler, U., & Roschanski, N. (2017). Environmental emission of multiresistant *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene mcr-1 from German swine farms. *J Antimicrob Chemother*, 72, 1289-1292.
- Gunn, J. S. (2008). The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol*, 16, 284-290.
- Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C., Rogall, E. T., & Schwartz, T. (2017). Occurrence of the mcr-1 colistin resistance gene and other clinically relevant antibiotic resistance genes in microbial populations at different municipal wastewater treatment plants in Germany. *Front Microbiol*, 8, 1282.
- Hille, K., Roschanski, N., Ruddat, I., Woydt, J., Hartmann, M., Rösler, U., & Kreienbrock, L. (2018). Investigation of potential risk factors for the occurrence of *Escherichia coli* isolates from German fattening pig farms harbouring the mcr-1 colistin-resistance gene. *Int J Antimicrob Agents*, 51, 177-180.
- Huang, H., Dong, N., Shu, L., Lu, J., Sun, Q., Chan, E. W., Chen, S., & Zhang, R. (2020). Colistin-resistance gene mcr in clinical carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* strains in China, 2014–2019. *Emerg Microbes Infect*, 9, 237-245.
- Hurst, A. N., Scarbrough, B., Saleh, R., Hovey, J., Ari, F., Goyal, S., Chi, R. J., Troutman, J. M., & Vivero-Escoto, J. L. (2019). Influence of cationic meso-substituted porphyrins on the antimicrobial photodynamic efficacy and cell membrane interaction in *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci*, 20, 134.
- Jeannot, K., Bolard, A., & Plesiat, P. (2017). Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents*, 49, 526-535.
- Jeong, H., Choi, S. K., Ryu, C. M., & Park, S. H. (2019). Chronicle of a soil bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681 as a tiny guardian of plan and human health. *Front Microbiol*, 10, 1-16.
- Jin, L., Wang, R., Wang, X., Wang, Q., Zhang, Y., Yin, Y., & Wang, H. (2018). Emergence of mcr-1 and carbapenemase genes in hospital sewage water in Beijing, China. *J Antimicrob Chemother*, 73, 84-87.
- Jørgensen, S. B., Søråas, A., Arnesen, L. S., Leegaard, T., Sundsfjord, A., & Jenum, P. A. (2017). First environmental sample containing plasmid-mediated colistin-resistant ESBL-producing *Escherichia coli* detected in Norway. *Apmis*, 125, 822-825.
- Kassamali, Z., Jain, R., & Danziger, L. H. (2014). An update on the arsenal for multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: polymyxin antibiotics. *Int J Infect Dis*, 30, e125-e132.
- Kaye, K. S., Pogue, J. M., Tran, T. B., Nation, R. L., & Li, J. (2016). Agents of last resort: polymyxin resistance. *Infect Dis Clin North Am*, 30, 391-414.
- Kuti, J. L. (2016). Optimizing antimicrobial pharmacodynamics: a guide for your stewardship program. *Rev Méd Clin Las Condes*, 27, 615-624.
- Lee, K., Yong, D., Jeong, S. H., & Chong, Y. (2011). Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei Med J*, 5, 879-891.
- Leiminiaux, N. A., & Cameron, A. D. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol*, 65, 34-44.
- Lescat, M., Poirel, L., Tinguely, C., & Nordmann, P. (2018). A Resazurin Reduction-Based Assay for Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*, 57, e01563-18.
- Li, Z., Cao, Y., Yi, L., Liu, J. H., & Yang, Q. (2019). Emergent polymyxin resistance: end of an era? *Open Forum Infect Dis*, 6, 368.
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., & Shen, J. (2015). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*, 16, 161-168.
- Luque, S., Escaño, C., Sorli, L., Li, J., Campillo, N., Horcajada, J. P., Salas, E., & Grau, S. (2017). Urinary concentrations of colistimethate and formed colistin after intravenous administration in patients with multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 61, e02595-16.
- Lu, X., Zeng, M., Xu, J., Zhou, H., Gu, B., Li, Z., Jin, H., Wang, X., Zhang, W., Hu, Y., Xiao, W., Zhu, B., Xu, X., & Kan, B. (2019). Epidemiologic and genomic insights on mcr-1-harboring *Salmonella* from diarrhoeal outpatients in Shanghai, China, 2006-2016. *EBioMedicine*, 42, 133-144.

- Maalej, S. M., Meziou, M. R., Mahjoubi, F., & Hammami, A. (2012). Epidemiological study of *Enterobacteriaceae* resistance to colistin in Sfax (Tunisia). *Med Mal Infect*, 42, 256-263.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 18, 268-281.
- Mahmoudi, S., Mahzari, M., Banar, M., Pourakbari, B., Haghi, Ashtiani, M. T., Mohammadi, M., Keshavarz, Valian, S., & Mamishi, S. (2017). Antimicrobial resistance patterns of Gram-negative bacteria isolated from bloodstream infections in an Iranian referral paediatric hospital: A 5.5-year study. *J Glob Antimicrob Resist*, 11, 17-22.
- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23, 795.
- Martins, V. V., Zanetti, M. O. B., Pitondo-Silva, A., & Stehling, E. G. (2014). Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: a human health hazard. *Environ Sci Pollut Res Int*, 21, 5873-5878.
- Meirelles-Pereira, F., Pereira, A. M. S., Silva, M. C. G., Gonçalves, V. D., Brum, P. R., Castro, A. R., Pereira, A. A., Esteves, F. A., & Pereira, J. A. A. (2002). Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. *Braz J Microbiol*, 33, 287-293.
- Mendes, C. A. C., & Burdmann, E. A. (2009). Polymyxins - a review focusing on their nephrotoxicity. *Rev Assoc Méd Bras*, 55, 752-759.
- Menz, J., Olsson, O., & Kümmerer, K. (2019). Antibiotic residues in livestock manure: does the EU risk assessment sufficiently protect against microbial toxicity and selection of resistant bacteria in the environment?. *J Hazard Mater*, 379, 120807.
- Mlynarcik, P., & Kolar, M. (2019). Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of mcr genes. *Biomedical Papers*, 163, 28-38.
- Moffatt, J. H., Harper, M., & Boyce, J. D. (2019). Mechanisms of Polymyxin Resistance. *Adv Exp Med Biol*, 1145, 55-71.
- Mohamed, Y. F., Abou-Shleib, H. M., Khalil, A. M., El-Guink, N. M., & El-Nakeeb, M. A. (2016) Membrane permeabilization of colistin toward pan-drug resistant Gram-negative isolates. *Braz J Microbiol*, 47, 381-388.
- Moubareck, C. A. (2020). Polymyxins and bacterial membranes: a review of antibacterial activity and mechanisms of resistance. *Membranes*, 10, 1-30.
- Nation, R. L., Rigatto, M. H. P., Falci, D. R., & Zavascki, A. P. (2019). Polymyxin acute kidney injury: dosing and other strategies to reduce toxicity. *Antibiotics*, 8, 2-18.
- Nation, R. L., & Velkov, T., Li, J. (2014). Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese? *Clin Infect Dis*, 59, 88-94.
- Ngamprasertchai, T., Boonyasiri, A., Charoenpong, L., Nimitvilai, S., Lorchirachoonkul, N., Wattanamongkonsil, L., & Thamlikitkul, V. (2018). Effectiveness and safety of polymyxin B for the treatment of infections caused by extensively drug-resistant Gram-negative bacteria in Thailand. *Infect Drug Resist*, 11, 1219-1224.
- Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and 266 intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*, 5, 643.
- Ortwine, J. K., Kaye, K. S., Li, J., & Pogue, J. M. (2015). Colistin: understanding and applying recent pharmacokinetic advances. *Pharmacotherapy*, 35, 11-16.
- Ovejero, C. M., Delgado-Blas, J. F., Calero-Caceres, W., Muniesa, M., & Gonzalez-Zorn, B. (2017). Spread of mcr-1-carrying *Enterobacteriaceae* in sewage water from Spain. *J Antimicrob Chemother*, 72, 1050-1053.
- Pacheco, T., Bustos, R. H., González, D., Garzón, V., García, J. C., & Ramírez, D. (2019). An approach to measuring colistin plasma levels regarding the treatment of multidrug-resistant bacterial infection. *Antibiotics*, 8, 1-19.
- Papadimitriou-Oliveris, M., Christofidou, M., Fligou, F., Bartzavali, C., Vrettos, T., Filos, K. S., Marangos, M., & Anastassiou, D. (2014). The role of colonization pressure in the dissemination of colistin or tigecycline resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients. *Infection*, 42, 883-90.
- Pogue, J. M., Ortwine, J. K., & Kaye, K. S. (2017). Clinical considerations for optimal use of the polymyxins: a focus on agent selection and dosing. *Clin Microbiol Infect*, 23, 229-233.
- Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev*, 30, 557-596.
- Prim, N., Rivera, A., Rodríguez-Navarro, J., Español, M., Turbau, M., Coll, P., & Mirelis, B. (2016). Detection of mcr-1 colistin resistance gene in polyclonal *Escherichia coli* isolates in Barcelona, Spain, 2012 to 2015. *Euro Surveill*, 21, 30183.
- Prim, N., Turbau, M., Rivera, A., Rodríguez-Navarro, J., Coll, P., & Mirelis, B. (2017). Prevalence of colistin resistance in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*: A four-year cross-sectional study. *J Infect*, 75, 493-498.
- PubChem. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. Colistin. National Institutes of Health. (2022). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5311054>. (Accessed January 2022).
- PubChem. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. Polymyxin b. National Institutes of Health. (2022). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/49800004>. (Accessed January 2022).

- Qi, B., Gijsen, M., Van Brantegem, P., De Vocht, T., Deferm, N., Abza, G. B., Nauwelaerts, N., Wauters, J., Spriet, I., & Annaert, P. (2020). Quantitative determination of colistin A/B and colistin methanesulfonate in biological samples using hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal*, 12, 1183-1195.
- Rabanal, F., & Cajal, Y. (2017). Recent advances and perspectives in the design and development of polymyxins. *Nat Prod Rep*, 7, 886-908.
- Robey, M., O'Connell, W., & Cianciotto, N. P. (2001). Identification of *Legionella pneumophila* rcp, a pagP-like gene that confers resistance to cationic antimicrobial peptides and promotes intracellular infection. *Infect Immun*, 69, 4276-86.
- Roschanski, N., Falgenhauer, L., Grobbel, M., Guenther, S., Kreienbrock, L., Imirzalioglu, C., & Roesler, U. (2017). Retrospective survey of mcr-1 and mcr-2 in German pig-fattening farms, 2011–2012. *Int J Antimicrob Agents*, 50, 266-271.
- Sader, H. S., Farrell, D. J., Flamm, R. K., & Jones, R. N. (2014). Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009–2012. *Int J Antimicrob Agents*, 43, 328-334.
- Serwecinska, L. (2020). Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: risk to the environment and to public health. *Water*, 12, 3313.
- Shen, Y., Wu, Z., Wang, Y., Zhang, R., Zhou, H. W., Wang, S., Lei, L., Li, M., Cai, J., Tyrrell, J., Tian, G. B., Wu, C., Zhang, Q., Shen, J., Walsh, T. R., & Shen, Z. (2018). Heterogeneous and Flexible Transmission of *mcr-1* in Hospital-Associated *Escherichia coli*. *mBio*, 9, e00943-18.
- Sherry, N., & Howden, B. (2018). Emerging Gram negative resistance to last-line antimicrobial agents fosfomycin, colistin and ceftazidime-avibactam - epidemiology, laboratory detection and treatment implications. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 16, 289-306.
- Sirijatuphat, R., & Thamlikitkul, V. (2014). Preliminary study of colistin versus colistin plus fosfomycin for treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 5598-5601.
- Sorlí, L., Luque, S., Li, J., Campillo, N., Danés, M., Montero, M., Segura, C., Grau, S., & Horcajada, J. P. (2019). Colistin for the treatment of urinary tract infections caused by extremely drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a call for a dose update. *J Infect*, 79, 253-261.
- Srinivas, P., & Rivard, K. (2017). Polymyxin resistance in Gram-negative pathogens. *Curr Infect Dis Rep*, 19, 1-9.
- Storey, D., McNally, A., Åstrand, M., Sa-Pessoa, J., Rodriguez-Escudero, I., Elmore, B., Palacios, L., Marshall, H., Hobley, L., Molina, M., Cid, V. J., Salminen, T. A., & Bengoechea, J. A. (2020). *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system-mediated microbial competition is PhoPQ controlled and reactive oxygen species dependent. *PLoS Pathog*, 16, e1007969.
- Strateva, T., Sirakov, I., Stoeva, T., Stratev, A., Dimov, S., Savov, E., & Mitov, I. (2018). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Current status of the problem in four Bulgarian university hospitals (2014-2016). *J Glob Antimicrob Resist*, 16, 266.
- Strepis, N., Voor in 't holt, A. F., Vos, M. C., Zandijk, W. H. A., Heikema, A. P., Hays, J. P., Severin, J. A., & Klaassen, C. H. W. (2021). Genetic Analysis of mcr-1-Carrying Plasmids From Gram-Negative Bacteria in a Dutch Tertiary Care Hospital: Evidence for Inpatient and Interspecies Transmission Events. *Front. Microbiol*, 12, 727435.
- Sumi, C. D., Heffernan, A. J., Lipman, J., Roberts, J. A., & Sime, F. B. (2019). What antibiotic exposures are required to suppress the emergence of resistance for Gram-negative bacteria? A systematic review. *Clin Pharmacokinet*, 58, 1407-1443.
- Sun, J., Zhang, H., Liu, Y. H., & Feng, Y. (2018). Towards understanding MCR-like colistin resistance. *Trends Microbiol*, 26, 794-808.
- Telhig, S., Sais, L. B., Zirah, S., Fliss, I., & Rebuffat, S. (2020). Bacteriocins to thwart bacterial resistance in Gram negative bacteria. *Front Microbiol*, 11, 1-25.
- Tran, T. B., Velkov, T., Nation, R. L., Forrest, A., Tsuji, B. T., Bergen, P. J., & Li, J. (2016). Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet? *Int J Antimicrob Agents*, 48, 592-597.
- Trimble, M. J., Mlynářčík, P., Kolář, M., & Hancock, R. E. W. (2016). Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6, a025288.
- Tuo, H., Yang, Y., Tao, X., Liu, D., Li, Y., Xie, X., Li, P., Gu, J., Kong, L., Xiang, R., Lei, C., Wang, H., & Zhang, A. (2018). The prevalence of colistin resistant strains and antibiotic resistance gene profiles in Funan River, China. *Front Microbiol*, 9, 3094.
- Vaara, M. (2019). Polymyxins and their potential next generation as therapeutic antibiotics. *Front Microbiol*, 10, 1-6.
- Velkov, T., Roberts, K. D., Nation, R. L., Thompson, P. E., & Li, J. (2013). Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol*, 8, 711-724.
- Velkov, T., Thompson, P. E., Nation, R. L., & Li, J. (2010). Structure – Activity relationships of polymyxin antibiotics. *J Med Chem*, 53, 1898-1916.
- Wallace, S. J., Li, J., Nation, R. L., Prankerd, R. J., Velkov, T., & Boyd, B. J. (2010). Self-assembly behavior of colistin and its prodrug colistin methanesulfonate: implications for solution stability and solubilization. *J Phys Chem*, 114, 4836-4840.
- Wang, Q., Wang, X., Wang, J., Ouyang, P., Jin, C., Wang, R., Zhang, Y., Jin, L., Chen, H., Wang, Z., Zhang, F., Cao, B., Xie, L., Liao, K., Gu, B., Yang, C., Liu, Z., Ma, X., Jin, L., Zhang, X., Man, S., Li, W., Pei, F., Xu, X., Jin, Y., Ji, P., & Wang, H. (2018). Phenotypic and genotypic characterization of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: data from a longitudinal large-scale CRE study in China (2012–2016). *Clin Infect Dis*, 67, S196-S205.

- Wang, R., van Dorp, L., Shaw, L. P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., Jin, L., Zhang, Q., Liu, Y., Rieux, A., Dorai-Schneiders, T., Weinert, L. A., Iqbal, Z., Didelot, X., Wang, H., & Balloux, F. (2018). The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat Commun*, 9, 1-9.
- Wang, X., Wang, Y., Wang, Y., Zhang, S., Shen, Z., & Wang, S. (2018). Emergence of the colistin resistance gene *mcr-1* and its variant in several uncommon species of *Enterobacteriaceae* from commercial poultry farm surrounding environments. *Vet Microbiol*, 219, 161-164.
- Wenzler, E., Fraidenburg, D. R., Scardina, T., & Danziger, L. H. (2016). Inhaled antibiotics for Gram-negative respiratory infections. *Clin Microbiol Rev*, 29, 581-632.
- Wright, M. S., Suzuki, Y., Jones, M. B., Marshall, S. H., Rudin, S. D., van Duin, D., Kaye, K., Jacobs, M. R., Bonomo, R. A., & Adams, M. D. (2015). Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 536-543.
- Xiaomin, S., Yiming, L., Yuying, Y., Zhangqi, S., Yongning, W., & Shaolin, W. (2020). Global impact of *mcr-1*-positive *Enterobacteriaceae* bacteria on “one health”. *Crit Rev Microbiol*, 46, 565-577.
- Xu, A., Zheng, B., Xu, Y. C., Huang, Z. G., Zhong, N. S., & Zhuo, C. (2016). National epidemiology of carbapenem-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative bacteria expert review of anti-infective therapy 15 isolated from blood samples in China in 2013. *Clin Microbiol Infect*, 22, 1-8.
- Yahav, D., Farbman, L., Leibovici, L., & Paul, M. (2012). Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect*, 18, 18-29.
- Yang, D., Qiu, Z., Shen, Z., Zhao, H., Jin, M., Li, H., Liu, W., & Li, J. W. (2017). The occurrence of the colistin resistance gene *mcr-1* in the Haihe River (China). *Int J Environ Res Public Health*, 14, 576.
- Yu, Z., Qin, W., Lin, J., Fang, S., & Qiu, J. (2015). Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *BioMed Res Int*, 2015, 679109.
- Zakuan, Z. D., & Suresh, K. (2018). Rational use of intravenous polymyxin B and colistin: A review. *Med J Malaysia*, 73, 351-359.
- Zavascki, A. P., Goldani, L. Z., Li, J., & Nation RL. (2007). Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother*, 60, 1206-1215.
- Zavascki, A. P., & Nation, R. L. (2017). Nephrotoxicity of polymyxins: is there any difference between colistimethate and polymyxin B? *Antimicrob Agents Chemother*, 61, e02319-16.
- Zhou, H. W., Zhang, T., Ma, J. H., Fang, Y., Wang, H. Y., Huang, Z. X., Wang, Y., Wu, C., & Chen, G. X. (2017). Occurrence of plasmid-and chromosome-carried *mcr-1* in waterborne *Enterobacteriaceae* in China. *Antimicrob Agents Chemother*, 61.
- Zurfluh, K., Poirel, L., Nordmann, P., Nuesch-Inderbinen, M., Hachler, H., & Stephan, R. (2016). Occurrence of the plasmid-borne *mcr-1* colistin resistance gene in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in river water and imported vegetable samples in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*, 60, 2594-2595.

APÊNDICE B – ARTIGO 2 ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Date: 14 Nov 2022
To: "Isabella Macário Ferro Cavalcanti" bel_macario@yahoo.com.br
cc: roxane@butantan.gov.br, roxane.piazza@butantan.gov.br, lhrosa@icb.ufmg.br
From: "BJMI - Editorial Office" narmadha.purusothaman@springer.com
Subject: Your Submission BJMI-D-22-00939
Attachment(s): Revision_Due.ics

Dear Dr. Cavalcanti,

We have received the reports from our advisors on your manuscript, "Gram-negative bacilli carrying mcr gene in Brazil: a pathogen on the rise", submitted to Brazilian Journal of Microbiology

Based on the advice received, I have decided that your manuscript can be accepted for publication after you have carried out the corrections as suggested by the reviewer(s).

Below, please find the reviewers' comments for your perusal.
 You are kindly requested to also check the website for possible reviewer attachment(s).

While submitting, please check the filled in author data carefully and update them if applicable - they need to be complete and correct in order for the revision to be processed further.

Please submit your revised manuscript online by using the Editorial Manager system which can be accessed at:

<https://www.editorialmanager.com/bjmi/>

Your username is: *****

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page.

I am looking forward to receiving your revised manuscript before 14 Dec 2022.

In order to add the due date to your electronic calendar, please open the attached file.

With kind regards,
 Roxane M Piazza
 Associate Editor
 Brazilian Journal of Microbiology

APÊNDICE C - ARTIGO 4 SUBMETIDO

Environmental Pollution

Escherichia coli as a biomarker of the spread of Antimicrobial Resistance (AMR) in the state of Paraíba, Brazil
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	ENVPOL-D-22-09335
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Mammals, birds, wildlife, Arctic, marine
Keywords:	CTX-M; Biofilm; Clonal Profile; One health.
Corresponding Author:	Sérgio Dias Costa-Júnior, PhD Paraíba Federal University João Pessoa, BRAZIL
First Author:	Sérgio Dias Costa-Júnior, PhD
Order of Authors:	Sérgio Dias Costa-Júnior, PhD
	Vinicius Pietta Perez, Dr
	Almy Filho, master
	Artur Fernandes, Dr
	Rayanna Alves, Dra
	Roner Rodrigues, Dr
	Hernande Silva, Dr
	Celso Oliveira, Dr
	Eloiza Campana, Dra
	Maria Oliveira, Dra
Abstract:	Escherichia coli is a microorganism with a wide distribution in different compartments. The objective of this research was to characterize E. coli isolates and evaluate the dynamics of dissemination of these isolates in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. For this, 11 bacterial isolates from raw milk, and 26 clinical isolates from hospitals in two hospitals in the state were investigated. All isolates were obtained between september 2021 and may 2022. Identification at the species level was performed by MALDI-TOF. After, the strains were submitted to the disk-diffusion test in agar. Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed to detect 26 beta-lactamase genes and mcr-1 gene. ERIC-PCR was used to determine the clonal profile. The methods of staining with Crystal Violent (CV) and growth in Congo red medium were applied and compared to analyze the ability to produce biofilm. Thus, 84 microorganisms were isolated from milk samples, 13.4% (n=11) belonged to the E. coli species. The blaCTX-M-1/2 gene was the most prevalent in both milk and clinical samples: 18.2% (2/11) and 23.1% (6/26), respectively. Furthermore, blaOXA-1 was detected in one (9.1%) milk sample and four (15.4%) clinics. The blaGES, blaNDM and blaSHV genes were detected only in samples of human origin, in 19.2% (5/26), 3.8% (1/26) and 3.8% (1/26), respectively. This is the first report of blaNDM in the state of Paraíba. Higher proportion of biofilm-producing strains among clinical isolates (73.1%, n=19) when compared to raw milk strains (45.4%, n=5). In ERIC-PCR analysis was observed to presence of 31 clonal profiles with the dissemination of clones in milk samples from different tanks and in different patients in the hospital environment. This research identified resistance determinants in these different compartments in the state of Paraíba, which are possibly related to environmental factors that may contribute to the spread of AMR.