



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS SOBRAL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ERIKA ALEXANDRA DAZA CARDONA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENE *mcr* E SUAS VARIANTES
EM ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE SERES HUMANOS, ANIMAIS, ÁGUAS E
ALIMENTOS EM SOBRAL, CE: UMA ABORDAGEM DE SAÚDE ÚNICA**

SOBRAL, CE

2021

ERIKA ALEXANDRA DAZA CARDONA

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENE *mcr* E SUAS VARIANTES
EM ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE SERES HUMANOS, ANIMAIS, ÁGUAS E
ALIMENTOS EM SOBRAL, CE: UMA ABORDAGEM DE SAÚDE ÚNICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, *Campus* Sobral, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Biologia Molecular dos Microrganismos.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa.

Coorientadora: Profa. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle

SOBRAL, CE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D318d Daza Cardona, Erika Alexandra.
DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENE *mcr* E SUAS VARIANTES EM ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE SERES HUMANOS, ANIMAIS, ÁGUAS E ALIMENTOS EM SOBRAL, CE: UMA ABORDAGEM DE SAÚDE ÚNICA / Erika Alexandra Daza Cardona. – 2022.
92 f. : il.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa.
Coorientação: Prof. Dr. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle.
1. gene *mcr*. 2. polimixinas. 3. colistina. 4. resistência bacteriana. 5. saúde única. I. Título.
CDD 610
-

ERIKA ALEXANDRA DAZA CARDONA

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENE *mcr* E SUAS VARIANTES
EM ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE SERES HUMANOS, ANIMAIS, ÁGUAS E
ALIMENTOS EM SOBRAL, CE: UMA ABORDAGEM DE SAÚDE ÚNICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade Federal do Ceará,
Campus Sobral, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde. Área de concentração: Biologia
Molecular dos Microrganismos.

Aprovada em: 14/12/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - *Campus* Sobral

Prof. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle (Coorientadora)
Universidade Estadual Vale do Acaraú

Prof. Dra. Beatriz Gonçalves Neves
Universidade Federal do Ceará - *Campus* Sobral

Prof. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos
Universidade Federal do Ceará - *Campus* Sobral

AGRADECIMENTOS

Eu quero agradecer a muitas pessoas que contribuíram neste processo. Foi um caminho longo, difícil, mas me permitiu conhecer a os que agora posso chamar: meus novos amigos.

Gostaria de agradecer a **Deus**, pela oportunidade da vida, de fazer meus estudos e por ter dado a melhor família do mundo. Posso começar pelos meus pais, **Maria Gricelda Cardona Patiño** e **Francisco Javier Daza**. Eles são meu exemplo de constância, luta, amor, paciência mas sobre todo de força nas adversidades, eles me fizeram uma grande mulher, pessoa e profissional. Todo o esforço é para vocês. Meus irmãos: **Francisco Andrés Daza Cardona** e **Javier José Daza Bandera**, exemplo de amizade e verdadeiro amor. Todos eles foram o motor que desde a distância fez que as coisas se tornassem melhor. Além disso, eu quero agradecer a meu enamorado: **Jhon J. Buenhombre Vasquez** o melhor companheiro da viagem, melhor amigo, meu amor, apoio, suporte, seu sobrenome contém tudo o que ele poderia fazer por mim, agradeço tanto amor, paciência e ajuda nesta travessia e mesmo nos experimentos, e como sempre dissemos: juntos da mão de Deus pelo mundo. Isto apenas é o começo. Finalmente e não menos importante, agradeço a meu cachorro **Enzo bebé**, sempre teve no meu coração a ilusão de te ver “mi negrito hermoso” Não foi uma decisão fácil sair de casa e deixá-los, mas agora os frutos estão aparecendo.

Agradeço as bolsas concedidas pela **CAPES** e, além disso, à **Organização de Estados Americanos (OEA)**, graças a eles tive a oportunidade de fazer meu mestrado e conhecer o Brasil.

À **UFC**, que deu para mim a oportunidade de ter sido aluna e fazer todo o processo lá. Todos os funcionários, desde o **Jessé Lima** pela colaboração e ajudar mesmo remotamente nos meus assuntos. O pessoal da segurança não tenho palavras para agradecer o carinho, gentileza e o grande apoio nos momentos mais difíceis (a pandemia). O senhor **Antônio Lopes**, pessoa maravilhosa e que neste momento posso chamar “amigo”, sua bondade é infinita, o senhor **Clever**, o sorriso dele sempre foi um incentivo, o **Valdinar**, sempre falava comigo de Deus e assim eu ficava melhor e o senhor **Almino Conrado** que sempre tinha alguma coisa para falar e para praticar o espanhol, agradeço seu tempo para mim. Deus abençoe o caminho dessas pessoas sempre.

Agradeço a meu orientador o Professor **Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa**, pelo ensino, paciência, oportunidade de ter sido sua orientanda e toda a ajuda neste caminho longo.

A minha co-orientadora **Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle**, sua ajuda, empenho e preocupação sempre serão lembradas por mim, uma grande mulher, obrigada por ter me acolhido. Profissionais maravilhosos, que tive a oportunidade de conhecer e tenho certeza que vamos continuar trabalhando em pesquisas futuras.

Agradeço aos professores membros da banca **Dra. Beatriz Gonçalves Neves** e **Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos**, pelas contribuições e ajuda, para que o meu trabalho se tornara ainda melhor.

Meus mais sinceros agradecimentos para os auxiliares dos Laboratórios e o pessoal da universidade.

Agradeço aos amigos que viraram minha família. **Paulo de Tarso Teles Dourado de Aragão**, não consigo expressar toda a minha gratidão. A vida me deu um irmão no Brasil, você! Eu nunca esquecerei toda a ajuda, paciência, boa energia, as risadas, as piadas, os bons momentos, sua família. Uma grande pessoa em todos os sentidos da palavra. Sua colaboração no meu processo e nos experimentos foi vital. Gracias infinitas meu amigo.

Agradeço a meu amigo **Guilherme Prado**, sua boa e maravilhosa energia foi importante para mim. Fico muito agradecida pela disposição e ajuda no laboratório e fico muito feliz de ter conhecido ele.

Agradeço aos amigos: **Jesús Alberto Perez Guerrero**, meu amigo latino (Venezuela), me fez sentir mais perto da minha casa, sua ajuda foi fundamental no meu processo. **Jean Charles Kouman**, estudante de medicina da UFC, meu grande amigo da costa do marfim e companheiro da casa, me deu muita força nos piores momentos, seu grande coração o levarão muito longe, merece o melhor.

Agradeço a **Nívea Maria da Cunha Ferreira**, e a **Deissiane Rodrigues**, pela amizade, conselhos e os momentos bons.

Finalmente a minha pátria querida: **Colombia!** Si, si, Colombia; Sí, sí Caribe!

“Do fundo desta noite que persiste
A me envolver em breu – eterno a espesso,
A qualquer deus – se algum acaso existe,
Por mi alma insubjugável agradeço.
Nas garras do destino e seus estragos
Sob os golpes que acaso atira o acerta,
Nunca me lamentei – a ainda trago
Minha cabeça – embora em sangue – ereta.
Além deste oceano de lamúria,
Somente o horror das trevas se divisa:
Porém o tempo, a consumir-se em fúria,
Não me amedronta, nem me martiriza.
Por ser estreita a senda – eu não declino,
Nem por pesada a mão que o mundo espalma;
Eu sou dono e senhor de meu destino;
Eu sou o comandante de minha alma”

Trecho do Poema do William E. Henley

Eu amo esta terra onde nasci
Eu sou Colombiano até morrer
Em tempos bons ou ruins
Pelo que amo, vou ficar aqui...
Uma música não vai brotar
A liberdade desejada
Mas tal vez isso me faça sonhar
Com o que eu mais quero alcançar
Você tem que sonhar, sem acordar
Observando os campos florescer
E nas estradas, veja correr
A justiça é verdade.

Eu amo esta terra onde nasci
Eu sou Colombiano até morrer
Em tempos bons ou ruins
Pelo que eu amo vou ficar aqui.
Uma música não vai bastar
Para semear um futuro
Só lutando sem desistir
Uma ilusão renascera
À solução não está em sair
E em virar minhas costas para a verdade
Só a união nos dá força.

Recomeçar,
Somos uma raça sob o mesmo sol
Somos o legado do amor de Deus
O mesmo sangue a mesma dor
A mesma esperança no coração
Eu amo esta terra onde nasci
Eu sou Colombiano até morrer
Em tempos bons ou ruins
Pelo que eu amo, ficarei aqui

Bambuco Colombiano
Leonardo Laverde

RESUMO

A resistência antimicrobiana é reconhecida como um dos problemas globais mais importantes de saúde humana no século XXI. O equilíbrio entre a necessidade clínica e a prevenção de resistência é ainda mais comprometido pelo uso agrícola de antibióticos, uma vez que alguns países têm usado ativamente a colistina na produção animal. Microrganismos resistentes a antimicrobianos são encontrados em humanos, alimentos, animais, plantas e meio ambiente (água, solo e ar) podendo se disseminar entre ecossistemas. Foi relatada a presença de microrganismos isolados de amostras biológicas que expressam resistência plasmidial à colistina mediada pelo gene *mcr-1* ou suas variantes. O objetivo deste estudo foi detectar e caracterizar a presença do gene *mcr* responsável pela resistência à colistina em enterobactérias isoladas de seres humanos, animais, ambiente e alimentos. A identificação molecular dos genes *mcr-1* e *mcr-2* foi realizada pela Reação em cadeia da Polimerase (PCR), seguida pela corrida eletroforética em gel de agarose para análise do produto de amplificação. Nos isolados em que os genes *mcr* foram detectados foi realizada a avaliação do perfil de sensibilidade para sulfato de colistina pelo método de microdiluição em caldo (BMD). No total foram analisados 50 espécimes de *Escherichia coli* oriundas de seres humanos (n=14), aves (n=19), queijo (n=12) e água para consumo humano (n=5); além de 16 espécimes de *Klebsiella pneumoniae* isolados de seres humanos. Os resultados demonstraram a presença do gene *mcr-1* em uma cepa de *E. coli* isolada de queijo, em outra isolada de ave de granja e em três cepas de *K. pneumoniae* isoladas de amostras clínicas de seres humanos. Em nenhum isolado foi detectado o gene *mcr-2*. As cepas de *E. coli* positivas para o gene *mcr-1* apresentaram perfil de resistência para o sulfato de colistina com CIM de 4 µg/mL e as cepas de *K. pneumoniae* apresentaram perfil intermediário para colistina (CIM < 0,25 µg/mL). Portanto, esses dados revelam que enterobactérias de diferentes origens podem albergar o gene *mcr* responsável pela resistência à colistina, antibiótico amplamente utilizado na prática médica, contribuindo com informações de caráter molecular e epidemiológico em uma abordagem de Saúde Única, tema extremamente atual e relevante segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE).

Palavras-chave: gene *mcr*, polimixinas, colistina, resistência bacteriana, saúde única.

ABSTRACT

Nowadays, Antimicrobial resistance is recognized as one of the most important global human health problems in the 21st century. The balance between clinical need and resistance prevention is further compromised by agricultural antibiotic use, as some countries have actively used colistin in animal production. Antimicrobial-resistant microorganisms have been found in humans, food, animals, plants and the environment (water, soil and air), and they can disseminate between ecosystems. Microorganisms isolated from biological samples expressing plasmid resistance to the colistin mediated by the *mcr-1* gene or its variants have been reported. This study aimed to detect and characterize the *mcr* gene's presence responsible for colistin resistance in Enterobacteriaceae isolates from humans, animals, the environment and food. The molecular identification of the *mcr-1* and *mcr-2* was carried out through the Polymerase Chain Reaction (PCR), followed by an electrophoretic run in agarose gel to analyze the amplification product. In isolates in which *mcr* genes were detected, the sensitivity profile for colistin sulfate was evaluated using the Broth Microdilution (BMD) method. In total, 50 specimens of *Escherichia coli* from humans (n=14), poultry (n=19), cheese (n=12) and water for human consumption (n=5) were analyzed; in addition to 16 specimens of *Klebsiella pneumoniae* isolated from humans. The *mcr-2* gene was not detected in any isolate. The *E. coli* strains positive for the *mcr-1* gene showed a resistance profile to colistin sulfate with MIC of 4µg/mL and *K. pneumoniae* strains showed intermediate profile to colistin (MIC < 0,25 µg/mL). Therefore, these data reveal that enterobacteria of different origins can harbour the *mcr-1* gene responsible for the resistance to colistin, antibiotic widely used in medical practice, contributing with molecular and epidemiological information giving a One Health approach, an extremely current and relevant topic concern of the World Health Organization (WHO) and the World Organization for Animal Health (OIE).

Keywords: *mcr* gene, polymixins, colistin, bacterial resistance, one health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – O ecossistema integrado da transferência e disseminação da resistência antimicrobiana, ilustra a importância crítica de uma abordagem de Saúde Única para o problema.....	28
Figura 2 – Fatores envolvidos na disseminação da resistência, nos setores: Medicina humana, produção animal, agricultura de animais e meio ambiente.....	37
Figura 3 – Mecanismo de ação da Polimixina.....	40
Figura 4 – Regulação e vias mediadas por plasmídeo de modificações de lipopolissacarídeos em Enterobacteriaceae.....	41
Figura 5 – Representação esquemática do modelo evolutivo para as etapas da propagação do gene <i>mcr-1</i>	43
Figura 6 – Sistema automatizado VITEK 2®.....	57
Figura 7 – Cartão para identificação de bactérias pelo VITEK 2®.....	58
Figura 8 – Gel de agarose com bandas que corresponderam com o plasmídeo.....	64
Figura 9 – Fotos de gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela PCR realizada para a detecção do gene <i>mcr-1</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores ou primers usados para amplificação por PCR de genes <i>mcr</i>	60
Tabela 2 – Condições de ciclagem usados na reação do PCR para os genes <i>mcr-1</i> e <i>mcr-2</i>	60
Tabela 3 – Origem das amostras positivas para a presença do gene <i>mcr-1</i> -.....	65
Tabela 4 – Caracterização e perfil de sensibilidade dos isolados humanos positivos para o gene <i>mcr-1</i>	66
Tabela 5 – Resultado da CIM pelo método BMD para Sulfato de Colistina dos isolados <i>mcr-1</i> positivos.....	67
Tabela 6 – Frequências do gene <i>mcr-1</i> segundo a origem.....	68
Tabela 7 – Frequências dos isolados positivos para <i>mcr-1</i> com perfil intermediário à colistina pelo BMD.....	68
Tabela 8 – Teste Qui-Quadrado para o CIM perfil intermediário.....	69
Tabela 9 – Frequências dos isolados positivos para <i>mcr-1</i> com perfil de resistência à colistina pelo BMD.....	69
Tabela 10 – Teste Qui-Quadrado para o CIM perfil resistente.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMS	Assembleia Mundial de Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARGs	Genes de Resistencia
AROs	Organismos Resistentes
ATTC	Coleção de Cultura Tipo Americano
BHI	Caldo Infusão de Cérebro e Coração
CAMHB	Caldo Müller-Hinton com ajuste de cátions
CE	Ceará
CENA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Instituto Padrão Clínico de Laboratório
CNE	Centro Nacional de Ligação
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamonotetracético
ESBL	β -lactamases de Espectro Estendido
EUCAST	Comitê Europeu de provas de suscetibilidade aos antimicrobianos
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
GAP	Plano de Ação Global para a resistência antimicrobiana
GLASS	Sistema Global de Vigilância de Resistência Antimicrobiana
GPA	Antibióticos Promotores de Crescimento
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia y Estatística
ICA	Instituto Agrícola da Colômbia
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IS	Sequência de Inserção
MAPA	Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento
<i>mcr</i>	Gene que confere Resistência à Colistina Mediado por Plasmídeo
MIC	Concentração Inibitória Mínima
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde

OPS	Organização Pan-americana de Saúde
ORAS	Organismos Resistentes aos Antibióticos
ORF	Open Reading Frame
PAN-BR	Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PETN	Fosfoetanolamina transferível
RAM	Resistência Antimicrobiana
ReLAVRA	Rede Latino-americana de Vigilância de Resistência Antimicrobiana
RI	Repetição invertida
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SENASA	Serviço Nacional de Saúde e Qualidade Agrícola
SE	Solução padrão
SP	Solução Padrão
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

Km	Quilômetros
5 ^a	Quinta
%	Porcentagem
Dab	L- α , γ -diaminobutírico
PAP2	Fosfatase de ácido fosfatídico
Da	Dalton
β	Beta
mg	Miligrama
L	Litro
®	Marca Registrada
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
°C	Graus centígrados
hrs.	Horas
mM	Milimoles
NaOH	Hidróxido de Sódio
g/L	Gramas por litro
Vol/vol	Volume para volume
g	Gramas
min	Minutos
g.	Gravidades
-	Menos
s	Segundos
nm	Nanômetros
mA	Miliampères
V	Volts
Tm	Marca Comercial
bp	Pares de bases
μ L	Microlitro
μ g	Micrograma
μ g/mg	Micrograma sobre miligrama

UI/mg Unidades Internacionais sobre miligrama

$\mu\text{g/mL}$ Micrograma sobre mililitro

Ca^{++} Cálcio

Mg- Magnésio

> Maior

\pm Mais ou menos

\leq Menos que

gl Graus de liberdade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	Histórico	25
2.2	Abordagem de Saúde Única (<i>One Health</i>)	26
2.2.1	<i>Benefícios da abordagem de Saúde Única (<i>One Health</i>)</i>	30
2.3	Uso dos antimicrobianos em humanos, animais e plantas	31
2.3.1	<i>Uso em Seres Humanos</i>	32
2.3.2	<i>Uso em Animais</i>	32
2.3.3	<i>Uso em Plantas</i>	33
2.4	Resistência antimicrobiana (RAM) no contexto de Saúde Única	34
2.4.1	<i>Componente One Health da resistência aos antibióticos – Fatores contribuintes</i>	35
2.5	Polimixinas	38
2.5.1	<i>Colistina ou Polimixina E</i>	39
2.5.2	<i>Resistência as Colistinas</i>	40
2.5.2.1	<i>Mecanismos de resistência adquirida em Enterobacteriaceae – Gene mcr</i>	42
2.5.2.2	<i>Importância do conceito de Saúde Única na resistência à Colistina</i>	43
2.6	Epidemiologia na América	46
2.6.1	<i>A resposta Brasileira</i>	48
2.7	Controle de gene <i>mcr</i>	49
2.7.1	<i>Humanos e alimentos</i>	50
2.7.2	<i>Animais e ambientes</i>	51
2.8	Vigilância e controle	51
3	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	53
4	OBJETIVOS	54
4.1	Objetivo Geral	54
4.2	Objetivos Específicos	54
5	METODOLOGIA	55
5.1	Tipo de pesquisa	55
5.2	Aspectos éticos	55
5.3	Materiais e métodos	55

5.3.1	<i>Isolados bacterianos</i>	55
5.3.1.1	<i>Isolados de infecções humanas</i>	56
5.3.1.2	<i>Isolados de Animais</i>	56
5.3.1.3	<i>Isolados de Ambientes (águas)</i>	56
5.3.1.4	<i>Isolados de Alimentos (queijo)</i>	56
5.3.1.5	<i>Isolados de Ambientes (solo)</i>	56
5.3.2	<i>Reativação dos isolados bacterianos, confirmação da identidade bioquímica e análise do perfil de sensibilidade</i>	56
5.3.3	<i>Extração do DNA plasmidial</i>	58
5.3.4	<i>Quantificação do DNA plasmidial</i>	59
5.3.5	<i>Análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene <i>mcr-1</i> e <i>mcr-2</i></i>	59
5.3.6	<i>Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) à colistina pelo método de Microdiluição em Caldo (BMD)</i>	60
5.3.6.1	<i>Preparo da solução do antibiótico</i>	61
5.3.6.2	<i>Preparo e armazenagem da solução de colistina</i>	61
5.3.6.3	<i>Preparo do inóculo</i>	61
5.3.6.4	<i>Leitura dos resultados</i>	61
5.3.6.5	<i>Descarte de material e Sulfato de colistina</i>	62
5.4	<i>Análise dos prontuários</i>	62
5.5	<i>Análise estatística</i>	62
5.6	<i>Biossegurança</i>	62
6	RESULTADOS	63
6.1	<i>Isolados bacterianos</i>	63
6.1.1	<i>Isolados de Infecções de humanas</i>	63
6.1.2	<i>Isolados de Animais</i>	63
6.1.3	<i>Isolados de Ambientes (águas)</i>	63
6.1.4	<i>Isolados de Alimentos (queijos)</i>	63
6.2	<i>Extração do DNA plasmidial</i>	64
6.3	<i>Análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene <i>mcr-1</i> e <i>mcr-2</i></i>	64
6.4	<i>Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) à colistina pelo método de Microdiluição em Caldo (BMD)</i>	67

7	DISCUSSÃO.....	71
8	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	ANEXO A.....	89

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana (RAM) é reconhecida como um dos problemas globais mais importantes no século XXI (PRESTINACI *et al.*, 2015; SHAD, 2018; LIU *et al.*, 2019), além disso é um problema de epidemiologia complexa adaptada a uma abordagem mais ampla e integrada de “Saúde Única” ou “*One Health*” (RAMON-PARDO *et al.*, 2018). Nas últimas três décadas, a resistência aos antibióticos apresentou as mais significativas ameaças à saúde humana em todo o mundo. Se não forem encontradas soluções para impedir a resistência generalizada a esses fármacos, estima-se que até 2050, aproximadamente 10 milhões de pessoas por ano morrerão de infecções por microrganismos multidroga resistentes, que é mais do que o número de pessoas que morrerão de qualquer outro tipo de doença (LI, 2019). O impacto da resistência a antibióticos em termos de mortalidade e do custo da saúde pública é bastante difícil de estimar, e existem poucos estudos abordando esse problema (PRESTINACI *et al.*, 2015).

O problema da resistência antimicrobiana é atualmente visto sob dois conceitos complementares, *One Health* definido como esforço colaborativo de múltiplas disciplinas que trabalham em nível local, nacional e mundial para conseguir uma saúde ótima para as pessoas, animais e meio ambiente e *Global Health*, que é utilizado para resolver problemas associados a doenças infecciosas em geral e à RAM em particular. Ambos os conceitos são: holísticos e interdisciplinares e baseiam-se na ideia de que a saúde humana e saúde animal são interdependentes e estão ligadas à saúde dos ecossistemas dos quais fazem parte (ROBINSON *et al.*, 2016; HERNANDO-AMADO *et al.*, 2019).

A resistência antimicrobiana é um problema ecológico caracterizado por interações complexas envolvendo diversas populações microbianas que afetam a saúde dos seres humanos, animais e meio ambiente. Assim sendo, faz sentido abordar esse problema tanto pelos resíduos desses fármacos no ambiente, como pelas bactérias resistentes, levando em consideração a complexidade e natureza ecológica, usando uma abordagem coordenada e multissetorial, como a de “Saúde Única” (HARTBARTH *et al.*, 2015; MCEWEN; COLLIGNON, 2018). O uso de antibióticos em animais produtores de alimentos e em aquicultura é para promoção do crescimento, para tratamento e prevenção de doenças, e é provavelmente um dos principais contribuintes para o agravamento do problema global da resistência antimicrobiana (PRESTINACI *et al.*, 2015; TOUATI *et al.*, 2019; UDDIN *et al.*, 2021). Além disso o uso tanto na pecuária terrestre como aquicultura, é questionado com base

no fato de que esses sistemas de produção criam condições ideais para as bactérias fixarem genes que conferem resistência (ROBINSON *et al.*, 2016).

É por isso que o equilíbrio entre a necessidade clínica e a prevenção de resistência é ainda mais comprometido pelo uso agrícola de antibióticos usados para combater infecções humanas. A colistina é um dos antimicrobianos de escolha para o tratamento de infecções por microrganismos resistentes aos carbapenêmicos, mas alguns países têm utilizado ativamente esse fármaco na produção animal como promotor de crescimento (LIU *et al.*, 2016). A Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização Pan-americana da Saúde (OPS) e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças nos Estados Unidos claramente estão procurando evidências científicas na era pré-antibiótica para elucidar essa problemática da RAM. A OMS e a OPS recorrem também aos estados-membros para que tomem medidas que proíbam a utilização de antimicrobianos na profilaxia e como promotores do crescimento em animais destinados ao consumo humano (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD e ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2016; SHAD, 2018; XIA *et al.*, 2019), devido ao aumento de infecções em humanos por microrganismos resistentes aos antibióticos, assim como para estabelecer uma vigilância do uso de antibióticos em animais como promotores de crescimento (DIBNER *et al.*, 2007).

Recentemente, foi relatada a presença de microrganismos isolados de amostras biológicas humanas que expressam resistência à colistina mediada pelo gene *mcr-1* (*plasmid-mediated colistin resistance*) ou suas variantes (UGARTE SILVA *et al.*, 2018), mas LIU *et al.* (2016), assim como ZHI *et al.* (2016) e ISHII *et al.* (2018) já haviam relatado o surgimento de plasmídeos de resistência à colistina em *Escherichia coli* isolada de animais, alimentos e fontes humanas na China.

Portanto, apesar da atenção global com a RAM, estudos em relação ao gene *mcr* permanecem relativamente escassos em países em desenvolvimento que apresentam falhas na administração dos sistemas de saúde e na vigilância e controle da resistência antimicrobiana, fazendo com que este problema atual seja de importância para a saúde pública local e mundial.

A colistina tem sido amplamente utilizada na alimentação animal como promotor de crescimento na pecuária brasileira, principalmente em porcos e aves. Desde 2008, o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu níveis adequados para o uso desse antimicrobiano em frangos de corte, aves, porcos e bovinos. Contudo, após o

isolamento de *E. coli* resistente à colistina portadora do gene *mcr-1* em seres humanos e animais (incluindo o gado), o uso desse antibiótico na alimentação animal foi proibido no ano 2016 pelo MAPA, Comunicado de risco N°. 01/2016, seguindo as recomendações da OMS (MONTE *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2021). Além disso, em 2016, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) alertou para a descoberta de uma nova cepa de *E. coli* resistente à colistina em amostras de pacientes no Brasil, correlacionando o uso desse antimicrobiano na produção pecuária como promotor de crescimento animal ao surgimento de resistência a esse medicamento em bactérias que infectam seres humanos (MINISTERIO PUBLICO FEDERAL, 2016).

Desde abril de 2016, no continente Sul-americano, o mecanismo de resistência pelo gene *mcr* foi identificado em *E. coli* e outras enterobactérias, isoladas de amostras de alimentos, animais, mas também de amostras clínicas de pacientes (MEDINA, 2017), que podem ser sintomáticos ou assintomáticos (BARLAAM *et al.*, 2019), tendo sido também detectado esse gene em isolados obtidos de amostras de animais selvagens e de águas superficiais, demonstrando contaminação ambiental (MCEWEN e COLLIGNON, 2018).

Sendo importante destacar que na América do Sul, os genes *mcr-1* foram identificados em países como Brasil, Argentina, Colômbia, Equador, Venezuela, Chile e Peru, em espécimes de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium de diferentes amostras clínicas de humanos e animais, carne de frango e boi (INS, 2016; UGARTE SILVA *et al.*, 2018; PAPA-EZDRA *et al.*, 2019), e o gene *mcr-5* foi detectado em amostras de carne de frango em isolados de *E. coli* no Paraguai (NESPOROVA *et al.*, 2019).

Sobral é um município brasileiro no interior do estado do Ceará, localizada entre duas grandes capitais, Fortaleza, a cerca de 230 km, 5ª maior capital do país e Teresina, capital do Piauí, localizada a 360 km. Com uma população de 208.935 habitantes, conforme estimativa do IBGE de 2019, é o quinto município mais povoado do estado e o segundo maior do interior. Com uma taxa de urbanização de 88,35, sendo o segundo município mais desenvolvido do estado do Ceará, atrás apenas de Fortaleza, de acordo com o IDH (Índice de Desenvolvimento Humano). A Santa Casa de Misericórdia de Sobral e o Hospital Regional Norte respondem pela demanda de 75 municípios, com cerca de 1.750.000 habitantes, sendo Sobral um Centro de Referência em saúde para toda a região (<http://www.sobral.ce.gov.br>).

Assim sendo, uma vez que o isolamento de espécimes produtores do gene *mcr* deve ser considerado de alto risco epidemiológico é importante ressaltar a necessidade de se

pesquisar a presença desse gene e suas possíveis variantes na região norte do Estado do Ceará visando estimar um indicador epidemiológico de saúde pública em uma abordagem de “Saúde Única”.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

A história dos esforços para abordar as dimensões de “Saúde Única” sobre o uso de antimicrobianos em animais para consumo humano é de certa forma uma das preocupações de saúde pública (MCEWEN; COLLIGNON, 2018). Desde a década de 1950, a indústria avícola nos Estados Unidos e em outros países tem usado antibióticos em níveis subterapêuticos, como promotores de crescimento para melhorar o desempenho em termos de alimentação, conversão e ganho de peso (DIBNER; RICHARDS, 2005; DIAZ-SANCHEZ *et al.*, 2015), para tratamento de muitas doenças causadas por bactérias, bem como metafilaxia em todo o mundo (BARLAAM *et al.*, 2019).

O uso de antibióticos em animais para promoção do crescimento é altamente controverso, porque em vez de tratar doenças, são administrados a animais saudáveis, geralmente por períodos prolongados e frequentemente em doses subterapêuticas para melhorar a produção. Essas condições favorecem a seleção e disseminação de bactérias resistentes nos animais e em seres humanos através de alimentos ou outras vias ambientais (COLLIGNON; MCEWEN, 2019), além disso, existem evidências de que os genes de resistência podem ser transmitidos da microbiota animal para a microbiota humana (GREKO, 2001).

Além disso, a preocupação de que o uso de antibióticos na agricultura possa aumentar a frequência de genes de resistência a antibióticos em bactérias que vivem nas superfícies das plantas e que os genes, possam ser transferidos para bactérias clinicamente importantes, resultou em restrições mais rígidas ao uso de antibióticos na agricultura na Europa e Estados Unidos (PRESTINACI *et al.*, 2015).

Na década de oitenta, bactérias patogênicas multidroga resistentes (MDR) surgiram em todo o mundo, tendo sido recomendado a proibição do uso de antibióticos em animais como medida de precaução (DIBNER *et al.*, 2007). A OMS, com base em dados epidemiológicos de 1997, publicou um relatório sobre o impacto em medicina humana do uso de antimicrobianos em animais destinados ao consumo, sugerindo uma correlação entre o surgimento de patógenos MDR e o uso desses fármacos em veterinária (WHO, 2000) e é alarmante como as taxas de resistência continuam a aumentar (UDDIN *et al.*, 2022)

Nesse sentido, surgiram implicações e respostas das políticas internacionais de saúde numa abordagem “*One Health*” (RAMON-PARDO *et al.*, 2018) para resolver o crescente problema de saúde pública da resistência antimicrobiana, começando com a 68ª Assembleia Mundial da Saúde organizada pela OMS que adotou um Plano de Ação Global para a Resistência Antimicrobiana (GAP), em maio de 2015 (WENJUAN YIN *et al.*, 2017; AIDARA-KANE *et al.*, 2018; YANG; BUTTERY, 2018), sobre a perspectiva de Saúde Única (RAMON-PARDO *et al.*, 2018).

O GAP da OMS tem como objetivo controlar a resistência antimicrobiana através de várias intervenções incluindo a redução do uso de antibióticos em humanos e animais. Nas assembleias da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE) foram adotadas resoluções para apoio do GAP (AIDARA-KANE *et al.*, 2018). Adicionalmente, a Assembleia Mundial de Saúde (AMS), aprovou o GAP e solicitou que a OMS estabelecesse um Sistema Global de Vigilância de Resistência Antimicrobiana (GLASS), que permitisse a geração de relatórios globais padronizados dos dados oficiais e nacionais de RAM, colaborando com as redes regionais e nacionais de vigilância da resistência antimicrobiana para produzir dados oportunos e abrangentes (WHO, 2017; THAKUR; GRAY, 2019).

A primeira chamada de dados do GLASS ocorreu entre abril e julho de 2017, tendo sido este o primeiro ano da coleta de dados, houve uma grande variabilidade na complexidade e na qualidade dos dados enviados de RAM (WHO, 2017). O GLASS coleta e analisa dados clínicos e epidemiológicos de RAM dos países participantes, podendo gerar dados, melhorar a análise, influenciar decisões políticas e finalmente reduzir o ônus da RAM em todo o mundo (THAKUR; GRAY, 2019). Finalmente em 2017, a OMS orientou todos os estados membros para reduzir o uso de antibióticos em medicina veterinária (VAN BOECKEL *et al.*, 2019).

2.2 Abordagem de Saúde Única (*One Health*)

A abordagem multissetorial no enfrentamento da resistência poderá ser mais resolutiva do que ações focadas apenas na área de saúde humana. As bactérias resistentes podem circular entre seres humanos e animais por meio da alimentação, da água e do meio ambiente, e sua transmissão é influenciada pelo comércio, pelas viagens e pelas migrações humana e animal (REEVE-JOHNSON, 2017; RAMON-PARDO *et al.*, 2018; WALSH, 2018).

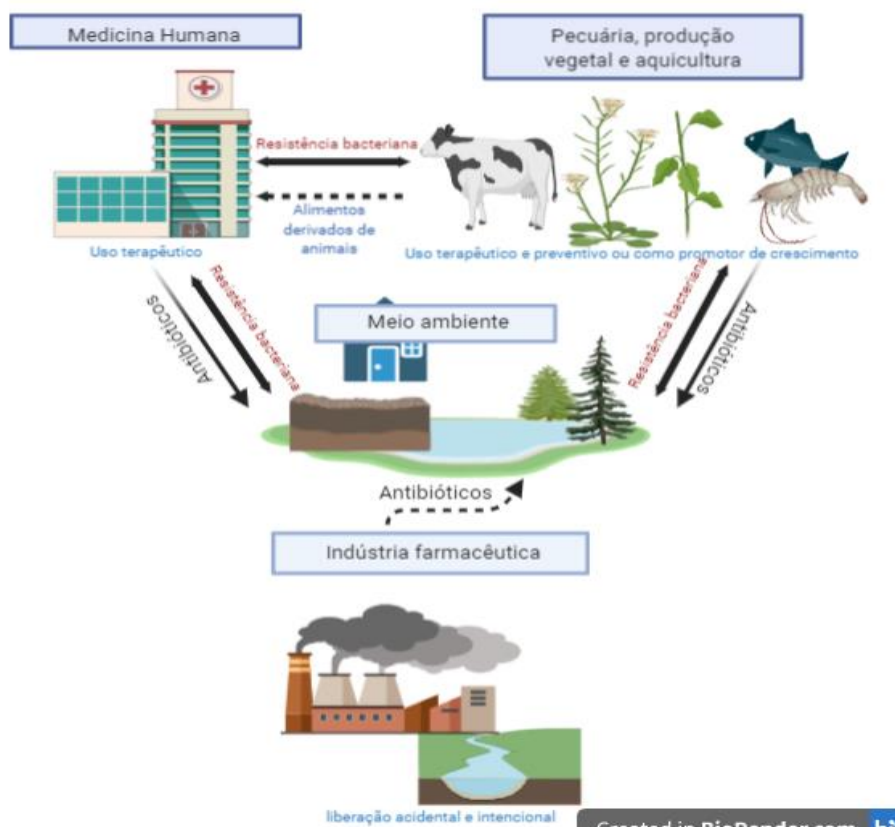
Um exemplo preocupante é o surgimento de um gene de resistência à colistina mediado por plasmídeo (*mcr-1*), que foi identificado em pessoas e porcos na China no ano de 2015, seguindo-se de sua rápida disseminação pela Europa, Canadá e Estados Unidos (ROBINSON *et al.*, 2016). Apesar da baixa frequência no Brasil, o gene *mcr-1* foi relatado em isolados clínicos de *E. coli* e *K. pneumoniae* (LORENZONI *et al.*, 2018).

A abordagem de Saúde Única, que se viu refletida na concepção do Plano de Ação Global, estabelece a necessidade desse envolvimento multissetorial, com o objetivo de assegurar a discussão dessa questão sobre as perspectivas conjugadas de saúde humana, animal e ambiental (ESTRELA, 2018; THAKUR; GRAY, 2019).

Saúde Única é definida pela OMS como um conceito de abordagem para a implementação de programas, políticas, legislação e pesquisa nos quais vários setores se comunicam e trabalham juntos para alcançar melhores resultados em Saúde Pública (WHO, 2017; COLLIGNON; MCEWEN, 2019), havendo um esforço colaborativo de vários profissionais de saúde juntamente com suas disciplinas e instituições relacionadas; trabalhando de forma local, nacional, e globalmente, para obter saúde ideal para as pessoas, animais domésticos, animais selvagens e plantas (MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

Promovendo uma visão de que, com o crescimento da população humana que é acompanhado por mudanças climáticas, aumento de poluição e esgotamento dos recursos terrestres, os profissionais de saúde e demais envolvidos devem trabalhar de forma conjunta para garantir a saúde e bem-estar dos seres humanos, animais e meio ambiente (MCEWEN e COLLIGNON, 2018). O conceito de Saúde Única é particularmente relevante e inclui segurança alimentar, controle de zoonoses e combate à resistência aos antibióticos; baseia-se na interdependência mútua de pessoas e animais, e no reconhecimento de que eles compartilham não apenas o mesmo ambiente, mas também muitas doenças e infecções (COLLIGNON; MCEWEN, 2019). Dessa forma, deve-se destacar a importância de uma abordagem multissetorial integrada e holística de Saúde Única no combate a RAM (Figura 1) (WHITE e HUGHES, 2019). A resistência que emergiu em bactérias comensais em animais representa um risco à saúde humana se puder ser transferida para os patógenos humanos. Essa transferência pode ocorrer no intestino humano, no ambiente e nos animais para consumo humano (HOELZER *et al.*, 2017).

Figura 1 - O ecossistema integrado de transferência e a disseminação da resistência antimicrobiana, ilustra a importância crítica de uma abordagem de Saúde Única para o problema.



Fonte: Adaptado do artigo de ANDERSON e HUGHES, 2019.

Dessa forma, a abordagem de Saúde Única consiste em uma estratégia mundial que começou e foi adotada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), no início do ano 2000, para a colaboração interdisciplinar e global entre os órgãos relacionados com a saúde das pessoas e dos animais. A importância desse conceito reside no fato de que a grande maioria das doenças infecciosas emergentes serem zoonoses (ESTRELA, 2018). Embora esse conceito não seja novo, a teoria já tinha sido apoiada por William Osler e Rudolf Virchow, o pai da Patologia Comparada, ela foi rearticulada na Medicina Veterinária e Saúde Humana (AMERICAN MEDICAL VETERINARY ASSOCIATION, 2008; ROBINSON *et al.*, 2016) por médicos pioneiros que reconheceram a importância de uma abordagem comparativa de investigação médica, e pelo veterinário estadunidense Calvin Schwabe que em 1984, cunhou o termo “Medicina Única” para ressaltar os muitos pontos em comum (MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

Portanto, essa abordagem encoraja os esforços colaborativos interdisciplinares que trabalham localmente, nacionalmente e globalmente para alcançar a saúde ideal para as pessoas, os animais e o ambiente (AMERICAN MEDICAL VETERINARY ASSOCIATION, 2008; ROBINSON *et al.*, 2016). Uma abordagem verdadeiramente importante de Saúde Única para lidar com RAM deve incorporar os três domínios (humano, animal: gado, aquicultura e meio ambiente) (AL-TAWFIQ *et al.*, 2017), e dependerá de uma compreensão sólida da importância relativa de cada um na evolução de bactérias e determinantes genéticos da RAM, das maneiras pelas quais eles interagem e das rotas de transmissão e mecanismos envolvidos (ROBINSON *et al.*, 2016).

A natureza ecológica da resistência antimicrobiana é um reflexo e consequência da interconectividade e diversidade da vida no planeta. Muitas bactérias patogênicas, os antimicrobianos que usamos para tratá-las e os genes que conferem resistência têm origens ambientais, como por exemplo no solo (COLLIGNON; MCEWEN, 2019). Dos três domínios, a saúde humana se destaca, devido a microrganismos com genes de resistência que agora são altamente prevalentes a múltiplas drogas em muitos patógenos importantes e comuns como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (ROBINSON *et al.*, 2016).

No caso das Polimixinas, estes antibióticos foram aprovados para uso na produção animal, em países como o Brasil (FERNANDES *et al.*, 2016) e a China (LIU *et al.*, 2016), assim como na Europa (EMA, 2013), sendo na maioria das vezes administrados por via oral a grupos de suínos, aves e em alguns casos, bezerros, tanto para o tratamento de infecções como para a profilaxia da diarreia causada por bactérias gram negativas, assim como para a promoção de crescimento. Nos países com dados disponíveis, as quantidades consumidas para a produção animal excedem amplamente as utilizadas nos seres humanos (COLLIGNON e MCEWEN, 2019), embora a OMS solicite o uso prudente de colistina (WHO; AGISAR, 2017).

Na Europa foi encontrada resistência à colistina em 3,9% dos isolados de *E. coli* oriundos de carne de frango e em 10,1% dos isolados dessa bactéria em carne de peru. A resistência a esse antimicrobiano era considerada limitada, sendo a mutação cromossômica considerada essencialmente intransferível. Contudo, em 2015 o gene de resistência à colistina transferível pelo plasmídeo *mcr-1* foi encontrado em isolados de *E. coli* obtidos de animais, alimentos e infecções da corrente sanguínea humana na China. Este gene foi isolado de amostras de animais selvagens e de águas superficiais demonstrando contaminação ambiental (COLLIGNON; MCEWEN, 2019).

No Brasil a colistina tem sido amplamente utilizada na alimentação animal como promotora de crescimento, principalmente em porcos e aves. Desde 2008, o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu níveis adequados para o uso desse antibiótico em frangos de corte, aves, porcos e gado bovino. Contudo, após o isolamento de *E. coli* resistente à colistina portadora do gene *mcr-1* ter sido relatado em seres humanos e animais (incluindo o gado), o uso da colistina na alimentação animal foi banido pelo MAPA, de acordo com as recomendações da OMS (MONTE *et al.*, 2017).

Contudo, em 2016, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) alertou para a descoberta de uma nova cepa de *E. coli* resistente à colistina em amostras de pacientes no Brasil, correlacionando o uso desse antimicrobiano na produção pecuária como promotor de crescimento animal e o surgimento de resistência em bactérias que infectam seres humanos (MINISTERIO PUBLICO FEDERAL, 2016). Dados da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo revelaram um aumento no uso desse medicamento de 2008 a 2015 (BOSZCZOWSKI *et al.*, 2019).

A colistina demonstra algumas dimensões de Saúde Única que são importantes na RAM e que diferem das cefalosporinas de terceira geração. Estas se referem, em particular, a história e aos padrões de uso da colistina em humanos e animais e a subsequente emergência de resistência às Polimixinas, provavelmente impulsionada pelo maior uso de colistina em animais do que em seres humanos, provavelmente por conta de sua toxicidade e da disponibilidade de outros antimicrobianos mais seguros e eficazes para uso humano, limitando o uso da colistina a aplicações tópicas (MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

2.2.1 Benefícios da abordagem de Saúde Única (One Health)

Essa abordagem visa melhorar a saúde humana e animal globalmente através da colaboração entre todas as ciências da saúde, especialmente entre as profissões médicas e veterinária para atender as necessidades críticas, enfrentando os novos desafios globais através da colaboração entre várias profissões: medicina veterinária, medicina humana, meio ambiente, vida selvagem e saúde pública; além de propiciar o desenvolvimento de centros de educação para treinamento em áreas específicas, através de colaboração aprimorada entre faculdades de medicina veterinária, medicina humana e saúde pública e aumentar o conhecimento científico para criar programas inovadores para melhorar a saúde (AMERICAN MEDICAL VETERINARY ASSOCIATION, 2008). Esta abordagem é uma estrutura

conceitual ideal para monitorar a resistência, o que permite integrar os diferentes aspectos da vigilância, além da saúde humana, nesse caso muitos autores propõem uma estrutura conceitual integrada (RAMON-PARDO *et al.*, 2018).

As abordagens atuais de Saúde Única para a RAM se concentram principalmente na redução do uso de antibióticos em animais para consumo (WHITE; HUGHES, 2019). Revisões sistemáticas e metanálises recentes encontraram associações entre a redução no uso de antibióticos em animais e a diminuição da RAM em animais, mas com evidência limitada da redução dessa resistência em humanos (HOELZER *et al.*, 2017; WHITE; HUGHES, 2019). Embora as diretrizes publicadas pela OMS sobre o uso de antibióticos em animais para consumo e em seres humanos sejam componentes importantes em relação à Saúde Única é necessária uma abordagem mais abrangente que envolva a vida selvagem, a aquicultura e principalmente o meio ambiente (THAKUR; GRAY, 2019). Os ecossistemas da vida selvagem são reservatórios importantes de organismos resistentes (AROs) e genes de resistência (ARGs). *E. coli* resistente a antibióticos foi encontrada em várias espécies silvestres, assim como isolados dessa bactéria com resistência mediada por plasmídeo, o que pode ser resultado da disseminação ambiental de antibióticos usados em humanos e animais (DOLEJSKA; PAPAGIANNITSIS, 2018; WHITE; HUGHES, 2019; ZHANG *et al.*, 2021). Alguns estudos descobriram ARGs em sistemas aquáticos e evidências de transferência horizontal de genes de bactérias aquáticas para patógenos humanos, esse uso envolve quantidades potencialmente grandes de antibióticos que são amplamente dispersos no ambiente aquático, proporcionando desafios de contenção (WHITE; HUGHES, 2019).

2.3 Uso dos antimicrobianos em humanos, animais e plantas.

A transmissão de resistência a antibióticos por *E. coli* via alimentação que provém de animais e outros produtos alimentares foi claramente demonstrada (HOELZER *et al.*, 2017; BARLAAM *et al.*, 2019). A grande maioria das classes antimicrobianas é usada em humanos e animais (incluindo aquicultura; peixes e mariscos de criação). Poucas classes de antibióticos estão reservadas exclusivamente para uso humano, como por exemplo os carbapenêmicos. Insetos e algumas plantas são frequentemente tratadas com antimicrobianos (COLLIGNON; MCEWEN, 2019). Antibióticos como tetraciclinas e estreptomicinas são usados para tratamento e profilaxia em frutas como maçãs e peras (VIDAVER, 2002; PRESTINACI *et al.*, 2015).

Além disso, a administração de antibióticos em animais e humanos pode levar a um aumento de resistência nas bactérias por causa da pressão seletiva exercida pelo uso desses antibióticos e aumento da transferência de genes de resistência bacterianos (BARLAAM *et al.*, 2019).

2.3.1 Uso em Seres Humanos

Nas pessoas os antibióticos de uma maneira geral são usados principalmente no tratamento de infecções clínicas de modo individual ou em grupo, e também de forma profilática (COLLIGNON; MCEWEN, 2019), mas devido à sua toxicidade, a colistina tem sido pouco usada em medicina humana (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD e ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2016; UGARTE SILVA *et al.*, 2018).

Na comunidade a prescrição excessiva de antibióticos por médicos de clínica geral, mesmo na ausência de indicações apropriadas, desempenha um papel importante no uso inadequado de antibióticos. A automedicação também desempenha um papel muito importante. No ambiente hospitalar, as intensas e prolongadas terapias antimicrobianas são provavelmente o principal contribuinte para o surgimento e a disseminação de infecções nosocomiais por microrganismos altamente resistentes a antibióticos (PRESTINACI *et al.*, 2015).

Além disso, o consumo de alimentos crus ou malcozidos de origem animal e a vida em áreas rurais foram identificados como fatores de risco para infecções por patógenos de origem alimentar que carregam genes de resistência antimicrobiana (HOELZER *et al.*, 2017).

2.3.2 Uso em Animais

A utilização de antimicrobianos em animais de estimação, como cães, gatos, pássaros e cavalos, é ampla e muito semelhante ao uso em seres humanos. Os antimicrobianos são usados para tratar infecções, e ocasionalmente para profilaxia pós-cirurgia (COLLIGNON; MCEWEN, 2019).

O uso de fármacos como promotores do crescimento (GPA) é definido como a prática de fornecer antibióticos aos animais saudáveis, esta concentração terapêutica aumenta

a produção animal, estabilizando a população bacteriana e permitindo a obtenção de mais nutrientes na dieta (DIAZ-SANCHEZ *et al.*, 2015). Por exemplo, em suínos aproximadamente 99% do uso da colistina é realizado por via oral para tratamento em massa em sistemas de criação intensiva (RHOUMA *et al.*, 2016). Dando origem a um grande problema, o portfólio de antimicrobianos usados na criação de animais destinados à alimentação humana está se esgotando rapidamente, com importantes consequências para a saúde animal, para os meios de subsistência dos agricultores e potencialmente para a saúde humana (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD e ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2016; VAN BOECKEL *et al.*, 2019). Infelizmente, a quantidade de informações disponíveis sobre o uso real de antimicrobianos em fazendas e confinamentos difere consideravelmente entre os países e, em muitos casos é insuficiente para entender as exposições aos antimicrobianos (HOELZER *et al.*, 2017).

A dinâmica da resistência antimicrobiana não é tão previsível e os riscos microbiológicos não podem ser tão facilmente avaliados, gerenciados e comunicados de maneira tão simples; como por exemplo, a toxicidade dos medicamentos, e isso pode afetar o desenvolvimento e a implementação oportuna da abordagem de Saúde Única para tratar da resistência aos antibióticos em animais (MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

2.3.3 Uso em Plantas

Antimicrobianos também são usados para o tratamento de doenças bacterianas e profilaxia em plantas e árvores frutíferas, como as que produzem maçãs e peras (VIDAVER, 2002; MCEWEN; COLLIGNON, 2018), por isso existe a preocupação de que o uso de antibióticos na agricultura possa aumentar a frequência de genes de resistência a antibióticos e possam ser transferidos a bactérias clinicamente importantes (PRESTINACI *et al.*, 2015). Essa problemática da resistência antimicrobiana relacionada às plantas começa a surgir nos anos sessenta, alguns anos após a introdução do antibiótico estreptomicina (VIDAVER, 2002). No caso de práticas agrícolas, como irrigação com águas residuais ou fertilização com resíduos animais como o esterco ou o excremento, podem contribuir para o aumento seletivo da resistência a antibióticos em ambientes terrestres (TOUATI *et al.*, 2019).

2.4 Resistência antimicrobiana (RAM) no contexto de Saúde Única

A resistência antimicrobiana é um problema complexo e multifacetado que ameaça a saúde humana e animal, a economia global e a segurança nacional e global (WHITE; HUGHES, 2019). O problema da RAM, é especialmente urgente em relação a resistência a antibióticos em bactérias (PRESTINACI *et al.*, 2015) e tem sido cada vez mais relatado em seres humanos, animais de estimação e animais de fazenda (DOLEJSKA; PAPAGIANNITSIS, 2018). A resistência aos antibióticos inicia-se na década de setenta entre bactérias gram negativas e é um problema global crucial (AGHAPOUR *et al.*, 2019), tendo em vista a globalização do sistema alimentar com o incremento da movimentação de animais e produtos agrícolas combinada com o aumento das viagens humanas, facilitando assim a rápida disseminação e mistura de genes de RAM (ROBINSON *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*; 2021).

Além disso, a RAM é considerada um dos desafios aos sistemas de saúde contemporâneos. Estima-se que 700 mil mortes sejam causadas anualmente pela resistência aos antimicrobianos. De acordo com essas análises, sem uma mudança de abordagem para conter o problema, até 2050, a RAM poderá causar mais mortes que o câncer (ESTRELA, 2018; LI, 2019). O impacto em pacientes particularmente vulneráveis é mais óbvio, resultando em doença prolongada e aumento da mortalidade (AMANN *et al.*, 2019). Os fatores políticos, socioeconômicos e culturais que influenciaram a difusão da RAM ainda estão longe de serem totalmente compreendidos, mas a globalização da produção de produtos alimentares e dos métodos de uso da terra tem maior impacto na saúde do ambiente e na segurança alimentar. Adicionalmente, a conectividade dos ambientes e das pessoas em diferentes escalas geográficas contribuiu para a disseminação da RAM (HERNANDO-AMADO *et al.*, 2019).

A RAM está definida pela OMS “como uma capacidade de um organismo de impedir um antimicrobiano de agir contra ele” (WHO, 2014). A OMS incluiu a RAM como uma das dez principais ameaças a saúde global em 2019 (WHITE; HUGHES, 2019). O desenvolvimento da resistência aos antibióticos é um fenômeno correlacionado ao uso excessivo dos antibióticos e a evolução bacteriana (AGHAPOUR *et al.*, 2019). Além disso, a RAM é prejudicial porque reduz a eficácia dos antimicrobianos e tende a aumentar a gravidade, incidência e custos da infecção. Atualmente, existem evidências consideráveis de que o uso de antimicrobianos em animais é um importante contribuinte para a resistência

antimicrobiana entre alguns patógenos humanos, em particular patógenos entéricos comuns como: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp. e *E. coli* (COLLIGNON; MCEWEN, 2019). É assim como a emergência de Enterobacteriaceae resistentes aos antimicrobianos é um problema de saúde pública em muitos países ao redor do mundo. Particularmente, os antimicrobianos que são prescritos para o tratamento de doenças bacterianas mostram uma reduzida susceptibilidade e falhas no tratamento (UDDIN *et al.*, 2022).

Os microbiomas de seres humanos, animais, plantas, água e solos estão interconectadas (HERNANDO-AMADO *et al.*, 2019), assim os microrganismos podem usar vários mecanismos para se adaptar contra agentes antimicrobianos e estimulantes ambientais. As bactérias podem usar alterações genéticas para formar genes com melhor desempenho para superar os antibióticos. A modificação em apenas alguns pares de bases no Ácido Desoxirribonucleico (DNA) causando a substituição de um ou alguns aminoácidos importantes na constituição da estrutura celular, parede celular e produção de enzimas; pode levar a formação de cepas mutantes resistentes (AGHAPOUR *et al.*, 2019). Também o movimento dos genes de resistência entre espécies bacterianas diferentes por meio de plasmídeos horizontais e transferência de genes aumenta a variedade de populações bacterianas com potencial de multirresistência (AL-TAWFIQ *et al.*, 2017).

As dinâmicas evolutivas da resistência antimicrobiana são ainda mais complicadas pelo potencial de resistência cruzada (a resistência simultânea a vários medicamentos relacionados que compartilham um alvo) e co-resistência (onde vários genes são transferidos juntos, por exemplo: para um plasmídeo e seleção para um dos genes seleciona indiretamente também para os outros). Além disso, a resistência antimicrobiana a um determinado medicamento pode ser mediada por múltiplas alterações genéticas com dinâmica evolutiva potencialmente diferente, e as taxas de mutação bacteriana variam predispondo potencialmente algumas bactérias com as “hiper-mutações” que levariam ao surgimento mais rápido de resistência do que outras mutações (HOELZER *et al.*, 2017).

2.4.1 Componente One Health da Resistencia aos antibióticos – Fatores contribuintes

Esses fatores contribuintes surgem como resultado de confluências locais entre bactérias que colonizam diferentes hospedeiros (incluindo animais e humanos) e seus ambientes onde os ARGs podem ser transferidos de seus hospedeiros para patógenos

bacterianos, além disso microrganismos que fazem parte de ecossistemas não clínicos, são em muitas ocasiões, os anfitriões originais de ARGs que foram transferidos de microrganismos ambientais para patógenos humanos (HERNANDO-AMADO *et al.*, 2019). Outro fator que faz da RAM uma questão importante são os ambientes propensos a doenças, padrões sanitários mais pobres e acesso reduzido a antibióticos eficazes (ROBINSON *et al.*, 2016).

Sabe-se que o ambiente clínico é uma fonte de resistência a antibióticos, devido ao seu amplo e intenso uso nesse ambiente, produzindo uma pressão natural seletiva nas bactérias (PRESTINACI *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2015; JIMÉNEZ PEARSON *et al.*, 2019). Além disso, a prescrição excessiva de antibióticos e automedicação desempenham um papel importante no uso inadequado de antibióticos, assim como a facilidade na disponibilidade dos medicamentos que podem ser adquiridos sem receita médica (PRESTINACI *et al.*, 2015).

A ampla gama de antibióticos que é liberada nas estações de tratamento de águas residuais como resultado do uso de antibióticos em residências, instalações de produção farmacêutica e hospitais têm o enorme potencial de exercer uma pressão seletiva em bactérias ambientais fazendo com que elas possam adquirir genes de resistência (ROCHA *et al.*, 2015). A Figura 2, mostra uma representação esquemática dos fatores envolvidos no surgimento e disseminação da resistência antimicrobiana, podendo-se identificar quatro setores principais envolvidos no desenvolvimento da resistência aos antibióticos: medicina humana na comunidade e hospitais, produção animal, agricultura e ambiente (PRESTINACI *et al.*, 2015; COLLIGNON; MCEWEN, 2019).

Figura 2 - Fatores envolvidos na disseminação da resistência, nos setores: medicina humana, produção animal, agricultura e meio ambiente.



Fonte: Adaptado do artigo de PRESTINACI *et al.*, 2015. **Lenda:** Esses setores estão conectados entre si, sendo o principal fator, o uso indiscriminado de antibióticos.

A ausência de indicações apropriadas, incerteza diagnóstica e automedicação têm um papel muito importante na resistência aos antibióticos, da mesma forma que o uso de antibióticos em animais produtores de alimentos e na agricultura. O uso de antibióticos como promotores de crescimento para o tratamento ou prevenção de doenças é provavelmente o maior contribuinte para o problema geral da resistência e, além disso, nos últimos anos a importância do meio ambiente na disseminação de resistência de antibióticos tem sido amplamente reconhecida. Por exemplo, a água potencialmente contaminada com microrganismo fecal e fertilizante pode disseminar bactérias resistentes a medicamentos no solo. Grandes quantidades de antibióticos são eliminadas nas águas residuais municipais devido ao metabolismo incompleto em seres humanos ou devido ao descarte de antibióticos não utilizados (PRESTINACI *et al.*, 2015).

No caso dos animais selvagens que não foram diretamente expostos aos antibióticos, eles são afetados pelo uso excessivo na medicina humana e veterinária. Os

habitats influenciados pelo homem criam importantes fontes de bactérias resistentes para o meio ambiente na vida selvagem. Aqueles animais que tendem a viver perto dos seres humanos, procuram comida nas cidades, aterros ou áreas com agricultura intensiva e têm mais possibilidade de transportar bactérias resistentes a antibióticos do que animais em áreas com pegadas humanas limitadas. Nesse contexto, os animais selvagens podem ser considerados indicadores de poluição ambiental por bactérias resistentes aos antibióticos em um determinado local (DOLEJSKA; PAPAGIANNITSIS, 2018).

Além disso, pesquisadores sugerem que melhorar o saneamento básico, garantir boa governança, melhorar o acesso a água potável, aumentar as despesas com a melhoria da assistência pública à saúde e melhorar a regulamentação do setor privado de saúde, são medidas necessárias para se reduzir a RAM. Outros fatores como falta de saneamento, temperaturas mais altas e corrupção, foram consistentemente associados a uma maior prevalência de cepas com RAM (THAKUR; GRAY, 2019).

De acordo com dados mais recentes sobre a resistência a antibióticos publicados pelo Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças, a resistência antimicrobiana em *E. coli* requer muita atenção porque a porcentagem de isolados resistentes a antibióticos comumente usados está aumentando muito na Europa (BARLAAM *et al.*, 2019). Assim como, nos últimos anos tem se observado um aumento rápido no número de *K. pneumoniae* multirresistente (PRESTINACI *et al.*, 2015).

2.5 Polimixinas

As polimixinas formam um grupo de antibióticos polipeptídicos que consiste em 5 compostos quimicamente diferentes (polimixinas A - E). Apenas a Polimixina B e a Polimixina E (Colistina) são utilizadas na prática clínica médica humana e veterinária (FALAGAS; KASIAKOU, 2005; REBELO *et al.*, 2018; BARLAAM *et al.*, 2019). Esses antibióticos têm sido amplamente utilizados em todo o mundo em soluções tópicas e oftálmicas há décadas (FALAGAS; KASIAKOU, 2005). As polimixinas exercem seu modo de ação antimicrobiano primário aumentando a permeabilidade da membrana externa por meio de uma interação direta com o Lipopolissacarídeo (LPS) (NANG *et al.*, 2019), além disso as polimixinas são considerados um dos últimos recursos para o tratamento de pacientes com infecções causada por bactérias multirresistentes gram negativas (MEDINA, 2017; BOSZCZOWSKI *et al.*, 2019; KNEIS *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2019; LU *et al.*, 2019).

2.5.1 Colistina ou Polimixina E

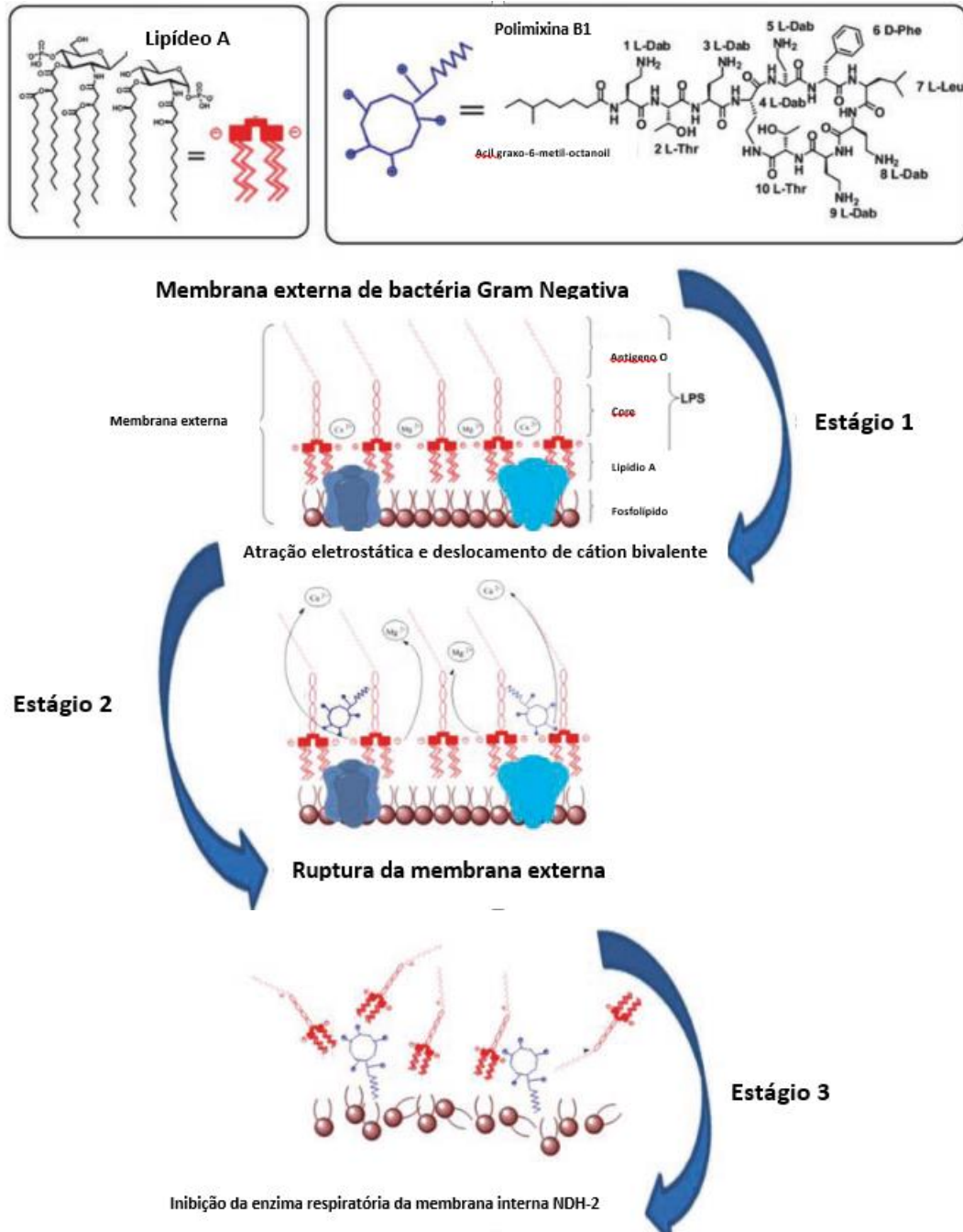
A colistina tem sido usada em pessoas e animais por mais de 50 anos (COLLIGNON; MCEWEN, 2019), foi descoberta em 1940 e é produzida pelo microrganismo *Paenibacillus polymyxa* var. *colistinus*, apresenta atividade bactericida contra bactérias gram negativas (EMA, 2013; ROSALES *et al.*, 2018; BARLAAM *et al.*, 2019), como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (TYRELL *et al.*, 2019), por outro lado, entre as enterobactérias, *Proteus* spp. e *Serratia marcescens* têm resistência intrínseca à colistina (AGHAPOUR *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2021).

Como nos adultos, a colistina foi um antimicrobiano usado em crianças entre os anos sessenta e oitenta, mas devido a sua toxicidade (nefrotoxicidade e hepatotoxicidade) seu uso foi abandonado (FALAGAS; KASIAKOU, 2005; ROSALES *et al.*, 2018; WISE *et al.*, 2018; LI, 2019; TYRELL *et al.*, 2019), mas nas últimas décadas, a disseminação de bactérias gram negativas multirresistentes associada à escassez de novos agentes antimicrobianos levou a utilização de colistina como um fármaco valioso para o tratamento de infecções causadas por essas bactérias (FALAGAS; KASIAKOU, 2005; HAO *et al.*, 2019; HAYASHI *et al.*, 2019; LI, 2019; ZHIFENG; TONY, 2019).

A colistina consiste em um decapeptídeo cíclico catiônico ligado a uma cadeia de ácido graxos através de uma ligação α -amida, seu peso molecular é de 1.750 Da (FALAGAS; KASIAKOU, 2005), essa molécula se liga ao componente lipopolissacarídeo da membrana externa. Esse antimicrobiano tem como alvo específico o lipídeo A, que tem um papel importante no controle da permeabilidade celular (BARLAAM *et al.*, 2019). Esse antibiótico realiza uma interação eletrostática inicial das cadeias laterais catiônicas de L- α,γ -diaminobutírico (Dab) com os grupos fosfatos do componente Lipídico A do LPS, deslocando cátions bivalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) que fazem a ponte adjacente com as moléculas de LPS (ZHIFENG e TONY, 2019), neste caso as polimixinas levam à morte celular bacteriana devido a atração eletrostática exercida entre as cargas positivas dos grupos amino e os ânions fosfato e carboxilato que compõem a camada de lipopolissacarídeos (MEDINA, 2017; SKOV; SKOV, 2017).

Em suma, como podemos visualizar na Figura 3, a interação entre ácidos graxos e outras regiões hidrofóbicas da camada de LPS causam mudanças na estrutura da parede celular bacteriana, promovendo a perda de seu conteúdo citoplasmático e o acesso à droga, que conseqüentemente exerce seu efeito bactericida (MEDINA, 2017).

Figura 3 - Mecanismo de ação das Polimixinas.



Fonte: ZHIFENG e TONY, 2019.

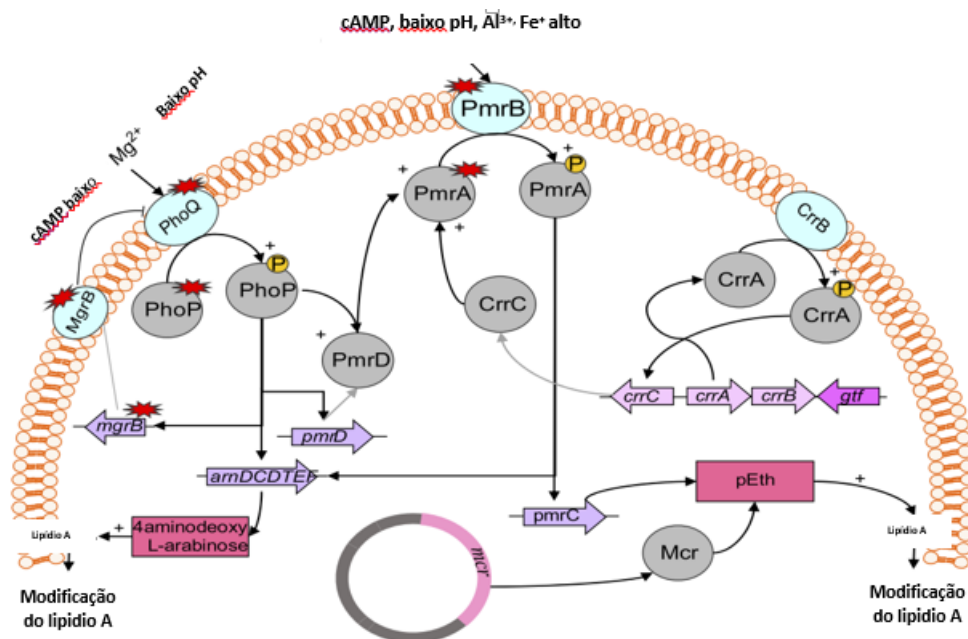
2.5.2. Resistência às Colistinas

Até o final de 2015, sabia-se que a resistência às Polimixinas em geral estava associada a mutações cromossômicas ou a mutações pontuais nos genes do cromossomo, mas Liu *et al.* (2016) identificaram um gene de resistência à colistina mediado por plasmídeo, *mcr-1* (*plasmid-mediated colistin resistance*) na China. Desde então nove diferentes genes

foram relatados, sendo *mcr-1* distribuído globalmente, enquanto *mcr-2* e *mcr-3* são detectados com menor frequência; *mcr-4*, -5, -6, -7, -8 foram descritos em 2018 (TOUATI *et al.*, 2019) e *mcr-9* e *mcr-10* em 2019 (CARROLL *et al.*, 2019), descobertos em várias espécies da família Enterobacteriaceae, de amostras de diferentes origens ao redor do mundo (LIU *et al.*, 2019). Mas o gene *mcr-1* e *mcr-9* são os genes que estão ainda mais disseminados ao redor do mundo na sua totalidade (LING *et al.*, 2020) A resistência adquirida à colistina permaneceu em baixos níveis ao longo dos anos, apesar do aumento significativo do seu uso (MEDINA, 2017). Entretanto, países como China, Vietnã, e Alemanha têm relatado uma maior frequência de amostras positivas para o gene *mcr-1* (WANG *et al.*, 2019).

Embora o principal mecanismo de resistência à colistina não seja claro, as bactérias gram negativas empregam vários mecanismos para se protegerem contra a colistina em relação a outras polimixinas (Figura 4). De acordo com a literatura, a maioria dos mecanismos da resistência a esse antimicrobiano é adaptativa. As estratégias mais comuns de resistência à colistina são modificações da membrana externa bacteriana por alteração do LPS e redução de sua carga negativa. Outras estratégias são a superexpressão dos sistemas de bombas de efluxo ou de polissacarídeo capsular (AGHAPOUR *et al.*, 2019)

Figura 4 - Regulação e vias mediadas por plasmídeo de modificações de lipopolissacarídeos em Enterobacteriaceae.



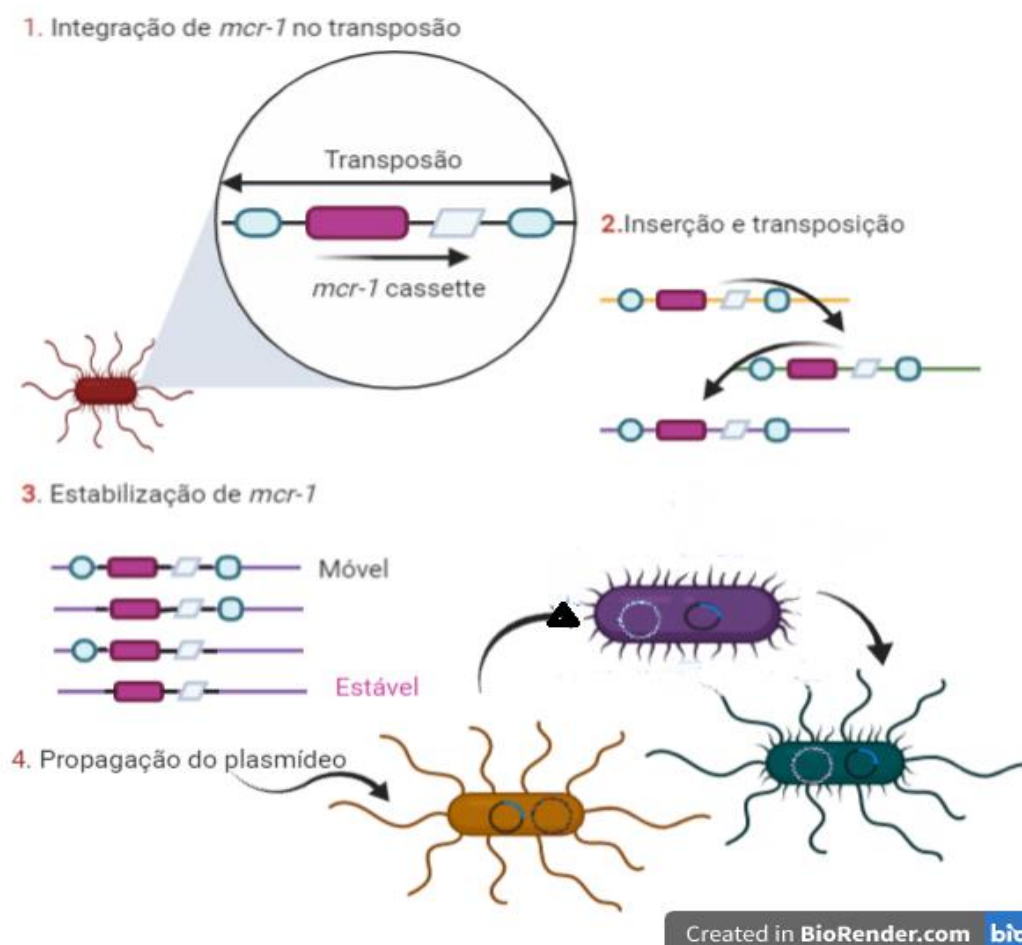
Fonte: AGHAPOUR *et al.*, 2019.

2.5.2.1 Mecanismos de resistência adquirida em Enterobacteriaceae – Gene *mcr*

Mecanismos de resistência à colistina adquiridos foram reconhecidos em alguns membros da família Enterobacteriaceae, como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., (AGHAPOUR *et al.*, 2019), *Aeromonas* spp., *Citrobacter* spp., *Raulotella* spp., *Kluyvera* spp. e *Providencia* spp. (HUSSEIN *et al.*, 2021) Apenas um mecanismo de resistência foi identificado como um mecanismo transferível (gene mediado por plasmídeo ou gene *mcr*) (LIU *et al.*, 2016; JIN *et al.*, 2018; AGHAPOUR *et al.*, 2019), tendo sido relatado em todo o mundo em animais produtores de alimentos, em carnes e menos frequentemente em seres humanos (DOLEJSKA; PAPAGIANNITSIS, 2018). O gene *mcr-1* foi detectado em diversas espécies de Enterobacteriaceae, principalmente *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas de seres humanos, animais, ambientes e alimentos em todo o mundo, seguido pela descoberta de suas variantes (HAYASHI *et al.*, 2019; HUSSEIN *et al.*, 2021). Além disso, tem sido descoberto o gene *mcr* em animais de estimação, onde a prevalência ainda não está bem esclarecida (WANG *et al.*, 2021)

O gene *mcr-1* codifica uma fosfoetanolamina transferase que modifica o Lipídeo A, reduzindo sua afinidade pela colistina (AL-TAWFIW *et al.*, 2017; XIA *et al.*, 2019; LING *et al.*, 2020). O modelo evolutivo proposto, é um gene mobilizado por um transposon composto formado por uma região de 2.600 pb contendo *mcr-1* (1.626 pb) e um quadro de leitura aberta (ORF - *Open Reading Frame*) que codifica uma proteína da superfamília PAP2 (765 pb), flanqueada por duas sequências de inserção IS*Apl1*. IS*Apl1* é um membro da família de sequências de inserção IS30 que utiliza um mecanismo de copiar e colar com uma via de transposição direcionada que requer a formação de um complexo sináptico entre uma repetição invertida (RI) no círculo de transposição em uma sequência tipo RI no alvo. Snestrud *et al.*, 2016 levantaram a hipótese de que, após a formação inicial de um transposon composto, essas sequências de inserção teriam sido perdidas ao longo do tempo, levando à estabilização do *mcr-1* em uma ampla gama de origens plasmídicas (Figura 5) (SNESRUD *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018).

Figura 5 - Representação esquemática do modelo evolutivo para as etapas da propagação do gene *mcr-1*.



Fonte: Adaptado do artigo de WANG *et al.*, 2018. **Lenda:** (1) A formação do transposon composto original seguida por (2) Transposição entre os plasmídeos antecessores e (3) estabilização por perda de elementos IS*Ap11* antes (4) da propagação mediada por plasmídeo.

Os genes *mcr* são responsáveis pela transferência horizontal da resistência à colistina. MCR é um gene membro da família de enzimas PETN e sua expressão leva à adição de Fosfoetanolamina Transferível (PETN) ao lipídeo A. Os isolados portadores do gene *mcr-1* exibem resistência à colistina sem outros mecanismos de resistência (AGHAPOUR *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2021).

2.5.2.2 Importância do conceito de Saúde Única na resistência à Colistina

Atualmente, a colistina é um antibiótico amplamente utilizado em Medicina Veterinária no tratamento de infecções intestinais causadas por bactérias da família

Enterobacteriaceae (RHOUMA *et al.*, 2016); em humanos, é usada no tratamento de infecções causadas por bactérias gram negativas MDR e é considerada como uma opção de tratamento de última escolha para o controle de infecções por enterobactérias produtoras de carbapenemase (GURJAR, 2015). Durante a última década, as pesquisas sobre este antimicrobiano experimentaram um aumento significativo, principalmente no que diz respeito ao mecanismo de resistência à colistina e à otimização de seu regime terapêutico (RHOUMA *et al.*, 2016).

Da mesma forma, em alguns países da América do Sul, foram tomadas medidas em relação ao uso desse tipo de antibióticos na agricultura. No caso da Colômbia, o Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural e o Instituto Agrícola da Colômbia (ICA) regulamenta as medidas de proibição do uso de colistina em outros usos que não seja o tratamento clínico em animais (ICA, 2015). No Brasil, a instrução normativa MAPA No° 45, de 30 de novembro de 2016 (comunicado de risco) foi reeditada visando proibir a importação e fabricação de sulfato de colistina com a finalidade de aditivo zootécnico (MINISTERIO PÚBLICO FEDERAL, 2016). No ano de 2019, na Argentina o SENASA (Serviço Nacional de Saúde e Qualidade Agrícola), determinou que não fosse administrado colistina ou qualquer um de seus sais a animais, a fim de preservar sua eficácia no tratamento de infecções humanas causadas por bactérias multirresistentes, assim como, proibiu em todo o território nacional a preparação, distribuição, importação, uso e posse de produtos veterinários que contenham o ingrediente ativo colistina e seus sais (SENASA, 2019).

Este tipo de resistência à colistina pelo gene *mcr* foi relatada em várias regiões incluindo Europa, Ásia, África e América e foi reconhecido em mais de 50 países ao redor do mundo (ISHII *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019), embora a frequência de isolados em humanos seja baixa em comparação com animais (AGHAPOUR *et al.*, 2019), mas a disseminação desses genes pode ser um sinal de uma nova era de bactérias resistentes aos medicamentos (RODRIGUES *et al.*, 2019). Desde abril de 2016 em nosso continente, o mecanismo de resistência pelo gene *mcr* foi identificado em *E. coli* e outras enterobactérias, isoladas de amostras de alimentos, animais, mas também de amostras clínicas de pacientes (MEDINA, 2017), que podem ser sintomáticos ou assintomáticos (BARLAAM *et al.*, 2019); também foi detectado em isolados obtidos de amostras de animais selvagens e de águas superficiais, demonstrando contaminação ambiental (MCEWEN e COLLIGNON, 2018).

O gene *mcr-1* foi encontrado em cepas de *E. coli* resistentes à colistina isoladas de vários animais de criação, como porcos, galinhas e gado (RHOUMA *et al.*, 2016), mas

também em isolados de aves migratórias selvagens, como a gaivota prateada (*Larus argentatus*) na Lituânia (RUZAUSKAS; VASKEVICIUTE, 2016) e gaivotas (*Larus dominicanus*) na Argentina, assim sendo, o papel dessas aves na disseminação do gene *mcr-1* entre continentes não deve ser subestimado (SHAD, 2018); e uma menor ocorrência em amostras clínicas de pacientes hospitalizados (MALBRÁN; INEI-ANLIS, 2016), em amostras ambientais e de seres humanos em todo o mundo (SHAD, 2018). Tendo sido encontrado principalmente em *E. coli*, mas também nas espécies de *Salmonella* e *K. pneumoniae*, confirmando que a disseminação desse gene é muito difundida (MALBRÁN; INEI-ANLIS, 2016).

A distribuição global do gene *mcr-1* pelo menos nos cinco continentes está bem documentada (WANG *et al.*, 2018) e na América foi reportado na Argentina e no Brasil, mas pouco se sabe sobre sua origem, aquisição, emergência e disseminação (SHAD, 2018; WANG, R *et al.*, 2018). Outra informação importante é que o gene *mcr-1* já existe há muito tempo (SKOV; MONNET, 2016), tendo sido encontrado em alta prevalência em vários ambientes, incluindo o Rio Haihe na China, em águas de praias urbanas no Brasil, em amostras fecais de indivíduos saudáveis (WANG *et al.*, 2018) e em águas de irrigação no Líbano (HMEDE *et al.*, 2019). Embora o Brasil e a China tenham banido o uso de colistina na agricultura, há evidências de que o gene *mcr-1* possa se disseminar em ambientes hospitalares, mesmo na ausência de uso desse antibacteriano (WANG *et al.*, 2018).

O gene *mcr-2*, foi relatado inicialmente em 2016 em espécimes de *E. coli* isoladas de suínos e bovinos na Bélgica, em um isolado de *E. coli* em suínos da Malásia, em dois isolados humanos de *K. pneumoniae* e *Salmonella* na Ásia e nos Estados Unidos, respectivamente (XAVIER *et al.*, 2016; REBELO *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2018; AGHAPOUR *et al.*, 2019). O gene *mcr-3* foi recentemente descoberto, identificado como um terceiro gene móvel de resistência à colistina, que coexistiu com 18 determinantes de resistência adicionais em isolados de *Aeromonas* spp. e *E. coli* oriundos de suínos e seres humanos (WENJUAN YIN *et al.*, 2017; REBELO *et al.*, 2018; AGHAPOUR *et al.*, 2019). O gene *mcr-3* foi detectado na Europa, Ásia e América do norte (XU *et al.*, 2018). O gene *mcr-4* foi identificado pela primeira vez em *E. coli* de suínos de vários países europeus como Itália, Espanha e Bélgica (REBELO *et al.*, 2018; BARLAAM *et al.*, 2019) e também foi detectado em isolados clínicos de *Enterobacter cloacae* produtor de carbapenemase em Singapura (XU *et al.*, 2018). A primeira detecção do gene *mcr-5* foi em uma amostra fecal humana no Japão (ISHII *et al.*, 2018), tendo sido depois encontrado em aves na Alemanha (REBELO *et al.*,

2018), e em diferentes espécies bacterianas de muitos países (MCEWEN; COLLIGNON, 2018; XU *et al.*, 2018).

Os mais recentes foram *mcr-6*, *-7* junto com o *mcr-8*, detectados em *K. pneumoniae* de animais e seres humanos (XAVIER *et al.*, 2016; WENJUAN *et al.*, 2017; AGHAPOUR *et al.*, 2019; BARLAAM *et al.*, 2019), embora os genes do *mcr-2* ao *mcr-8*, ainda não tenham sido descritos em microrganismos isolados de animais selvagens (DOLEJSKA e PAPAGIANNITSIS, 2018). Pesquisadores também descreveram um novo homólogo de *mcr* detectado durante uma triagem *in silico* de rotina de genomas de *Salmonella* sequenciados para genes de resistência antimicrobiana. A sequência de aminoácidos *mcr-9* foi detectada em um isolado de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*) multirresistente isolada de um paciente no estado de Washington, EUA (CARROLL *et al.*, 2019).

Na China, Wang *et al.*, no ano 2019 encontraram uma nova variante *mcr* designada *mcr-10*. Neste estudo, eles identificaram um novo gene *mcr* numa cepa de *Enterobacter roggenkampii*. O *mcr-10* tem cerca de 79,69% de similaridade de nucleotídeos com o *mcr-9*, codificando 82,93% de aminoácidos idênticos ao *mcr-9*. Contudo, o *mcr-10* conferiu um aumento de 4 vezes na CIM de colistina (1 a 4 mg/L) quando foi clonado em uma cepa de *E. roggenkampii* suscetível à colistina. Pesquisadores identificaram e caracterizam o novo gene, e também descobriram que ele foi disseminado globalmente, sugerindo que esse novo gene seja importante para a saúde e que a implementação de novas medidas de vigilância sanitária seja necessária (WANG *et al.*, 2020).

2.6 Epidemiologia na América

Análises retrospectivas demonstraram o gene *mcr-1* em várias espécies bacterianas isoladas de seres humanos, animais e amostras ambientais em vários países, e o gene foi encontrado em cerca de 5% dos viajantes saudáveis (COLLIGNON; MCEWEN, 2019).

Em dezembro de 2015, a agência de saúde pública do Canadá relatou a descoberta de gene *mcr-1* em três diferentes isolados de *E. coli*, coletados anteriormente para outros projetos de pesquisa no país. Um espécime foi isolado de ser humano e os dois outros foram isolados de carne bovina moída para venda coletadas em 2010 (MULVEY *et al.*, 2016; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD e ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2016; BARLAAM *et al.*, 2019).

No Brasil em 2016, pesquisadores informaram sobre a descoberta de *E. coli* produtora de *mcr-1* isolada de amostras de alimentos e animais (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD e ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2016), a maioria dos isolados apresentou coocorrência de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) do tipo CTX-M (VENDRUSCOLO, 2019). Na época, 19,5% das cepas de *E. coli* resistentes à colistina isoladas de carne de frango em 68 mercados localizados nas regiões Norte, Sul e Oeste de São Paulo, testaram positivo para *mcr-1* (MONTE *et al.*, 2017; BARLAAM *et al.*, 2019). Em seres humanos, o primeiro caso de *E. coli* apresentando o gene *mcr-1* ocorreu no estado do Rio Grande do Norte. Após essas descobertas, diversos relatos no Brasil foram publicados. Em seres humanos, sabe-se da existência de amostras positivas para o gene *mcr-1* no estado de Pernambuco, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (VENDRUSCOLO, 2019).

Da mesma forma foi isolado o gene *mcr-1* no Equador em um isolado de *E. coli* de origem humana, cuja sequência está depositada no Genbank® (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD e ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2016).

Em maio de 2016, na Argentina, o Laboratório Regional de Referência da Rede Latino-americana de Vigilância de Resistência Antimicrobiana (ReLAVRA), confirmou a detecção de cepas clínicas de *E. coli* portadoras do gene *mcr-1*. As cepas foram isoladas de 9 pacientes internados em seis hospitais diferentes, mas não tinham relação genética entre si e a resistência detectada era do tipo transferível. Seis desses pacientes eram do gênero masculino. E em cinco pacientes, os isolados foram associados a infecções graves (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD e ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2016; MALBRÁN; INEI-ANLIS, 2016; RAPOPORT *et al.*, 2016; UGARTE SILVA *et al.*, 2018).

Em Janeiro de 2016, o Contato Regional da OMS tem compartilhado com o Centro Nacional de Ligação (CNE) do Ministério da Saúde e Proteção Social a detecção de cepas de *E. coli* portadoras do gene *mcr-1* em viajantes da Bolívia, Peru e Colômbia (ARCILLA *et al.*, 2016; INS, 2016).

Em Maio de 2016 foi relatada na Colômbia a detecção do gene *mcr-1* em três isolados de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium de pacientes em Bogotá, Antioquia e Boyacá e em um isolado de *E. coli* de um paciente em Santander, essa descoberta foi produto de um estudo retrospectivo (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD e

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2016; INS, 2016; UGARTE SILVA *et al.*, 2018).

No Chile, em 2018, foram analisados 13 espécimes, sendo 5 de *A. baumannii*, 3 de *E. coli*, 4 de *K. pneumoniae* e 1 de *P. aeruginosa*; dos quais apenas um isolado era positivo para o gene *mcr-1* (LEGARRAGA *et al.*, 2018).

Em Agosto de 2017, foi detectado o gene *mcr-1* em 7 isolados de *E. coli*, resistentes à colistina no Peru (UGARTE SILVA *et al.*, 2018).

Em Junho de 2016, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, relataram a identificação do primeiro isolado do *E. coli* portador de gene *mcr-1* em um paciente (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD e ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2016; INS, 2016; UGARTE SILVA *et al.*, 2018). Além disso, a OPS e OMS alertaram para o fato de que pode haver bactérias não patogênicas portadoras desse gene e que o mesmo pode ser disseminado por plasmídeo para cepas virulentas ou clones hiper epidêmicos (UGARTE SILVA *et al.*, 2018).

Em 2019, no Uruguai foram descritos os primeiros isolados de *E. coli* que tem o gene *mcr-1*, esses foram obtidos de amostras de sangue, urina e amostra retais de diferentes pacientes em dois hospitais (PAPA-EZDRA *et al.*, 2019). O gene *mcr-5* foi detectado em amostras de carne de frango em isolados de *E. coli* no Paraguai (NESPOROVA *et al.*, 2019).

Portanto, o isolamento de espécimes produtores do gene *mcr* deve ser considerado de alto risco epidemiológico. Adicionalmente, ressalta-se a necessidade de se pesquisar a presença desse gene e suas possíveis variantes na nossa região para estimar um indicador epidemiológico de saúde pública em uma abordagem de “Saúde Única”

2.6.1 A resposta Brasileira

Em 2005, o Ministério da Saúde e a ANVISA, estabeleceram a “Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde”, para ampliar a detecção, a prevenção e o controle da emergência de resistência nos serviços de saúde no país. Outro destaque no enfrentamento à resistência antibacteriana no Brasil foi a regulamentação da venda de antibióticos, instituída em 2011 pela Anvisa para o controle da dispensação de antimicrobianos de uso humano. Antes dessa resolução, já havia a exigência de prescrição de antibióticos, medida considerada eficaz pela OMS para o enfrentamento ao uso desnecessário desses medicamentos. Mais recentemente, o MAPA regulamentou a utilização de

antimicrobianos de uso veterinário na alimentação animal por meio da Instrução Normativa nº 65/2006. Esse ministério também desempenha papel de liderança em iniciativas governamentais no controle e na prevenção de RAM na área de saúde animal, como o Programa Nacional de Controle de Patógenos, que visa monitorar e gerenciar o risco e a presença de patógenos em alimentos de origem animal como *Salmonella* em cortes de frango e suínos. Mobilizado pelas discussões do Plano Global e pelos compromissos internacionalmente firmados nos fóruns multilaterais correspondentes, o governo brasileiro passou à elaboração do Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (PAN-BR). O PAN-BR está pautado pelos princípios orientadores definidos pela OMS, FAO e OIE, destacando-se, em especial, a abordagem multissetorial, envolvendo diretamente o Ministério da Saúde, a ANVISA e o MAPA, e conta com o apoio do Ministério do Meio Ambiente, da Fundação Nacional de Saúde, do Ministério das Cidades, do MCTIC, entre outros órgãos (ESTRELA, 2018).

Em conformidade com o Plano Global, o PAN-BR é composto por eixos estratégicos, operacionais e de monitoramento e compreenderá o período de 2018 a 2022, sendo estruturado em cinco objetivos estratégicos: Melhorar a conscientização e a compreensão a respeito da resistência aos antimicrobianos por meio de comunicação, educação e formação efetivas; fortalecer os conhecimentos e a base científica por meio da vigilância e da pesquisa; reduzir a incidência de infecções com medidas eficazes de saneamento, higiene e prevenção de infecções; otimizar o uso de medicamentos antimicrobianos na saúde humana e animal e preparar argumentos econômicos voltados ao investimento sustentável, além de aumentar os investimentos em novos medicamentos, meios diagnósticos e vacinas e outras intervenções (ESTRELA, 2018).

2.7 Controle de gene *mcr*

A descoberta de cepas produtoras de gene *mcr* deve ser considerada de alto risco epidemiológico. Por isso é necessário o esforço máximo de todos os membros das equipes de saúde, especialmente dos Comitês de Controle de Infecções para evitar a disseminação desse tipo de mecanismo de resistência (INS, 2016).

De acordo com Barlaam *et al.* (2019), as ações ideais para melhor definir os riscos à saúde humana associados à disseminação de microrganismos pela cadeia alimentar podem ser resumidas como descrito a seguir:

2.7.1 Humanos e alimentos

Prevenir o uso de colistina como promotor de crescimento em todo o mundo; além disso, sua prescrição em medicina veterinária deve ser amplamente reduzida. Avaliar a prevalência de portadores humanos de *E. coli* com gene *mcr*, especialmente em manipuladores de alimentos para reduzir o risco de contaminação. Reduzir a propagação de microrganismos no ambiente hospitalar e avaliar a eficácia dos protocolos de higienização na indústria de alimentos, de fato alguns microrganismos são resistentes a desinfetantes que seriam eficazes contra seus homólogos suscetíveis aos antimicrobianos. Estudar a viabilidade de *E. coli* em alimentos crus e processados além de avaliar a prevalência de *E. coli* com gene *mcr* em alimentos prontos para consumo como saladas e frutas cortadas que representam uma rota para a transmissão de patógenos. Desenvolver protocolos específicos para monitoramento durante o processamento de alimentos (BARLAAM *et al.*, 2019).

Realizar testes de resistência à colistina em isolados de pacientes, é uma etapa crucial antes de realizar uma intervenção terapêutica com esse antibacteriano, e esses testes devem também ser feitos em isolados de pacientes com e sem histórico prévio do uso de colistina. Além disso, vale ressaltar que a higienização das mãos desempenha um papel crucial na prevenção de infecção por bactérias resistentes à colistina (RHOUMA *et al.*, 2016).

Também é importante prevenir a contaminação de seres humanos que têm contato direto com animais ou alimentos derivados de animais. Estudos epidemiológicos descreveram uma possível transmissão horizontal de cepas de *E. coli* resistentes à colistina isoladas de suínos (RHOUMA *et al.*, 2016). Olaitan *et al.* (2014) demonstraram o isolamento de *E. coli* resistente à colistina de indivíduos saudáveis sem uso prévio desse antibiótico (OLAITAN *et al.*, 2014).

Deve haver uma reavaliação do uso de colistina para descontaminação digestiva seletiva na unidade de terapia intensiva. Uma vez que esse fármaco algumas vezes é usado para descontaminação seletiva do trato digestivo por atingir bactérias aeróbias gram negativas resistentes em suínos (RHOUMA *et al.*, 2016).

Avaliação e otimização da terapia combinada com colistina. Estudos *in vitro* mostraram que a combinação de colistina com outros antimicrobianos, como rifampicina e imipenem, pode ser mais eficaz que a monoterapia com colistina no tratamento de infecções por bacterias gram negativas MDR em suínos (RHOUMA *et al.*, 2016).

2.7.2 Animais e ambientes

Planejar e intensificar a vigilância sobre a prevalência de *E. coli* com *mcr* em animais criados para alimentação visando avaliar os efeitos das medidas políticas adotadas pelo governo (BARLAAM *et al.*, 2019). Avaliar os possíveis riscos de origem alimentar relacionados à internalização de bactérias com gene *mcr* nas partes comestíveis dos vegetais (SOLOMON *et al.*, 2014) e proibir o uso de colistina como promotor de crescimento e controlar seu uso para fins de profilaxia e metafilaxia devido ao aumento da ocorrência desse antibiótico no ambiente, além disso deve-se reduzir o uso de antibióticos nas fazendas e na prática médica veterinária (RHOUMA *et al.*, 2016).

Rhouma *et al.* (2016) também ressaltam que veterinários devem diagnosticar clinicamente a doença, fazer o isolamento do agente patogênico e testes de antibiograma para determinar a sensibilidade bacteriana à colistina, ações essenciais para justificar o uso terapêutico desse antibiótico em suínos (RHOUMA *et al.*, 2016). Além disso, deve haver vigilância e monitoramento do uso de colistina nas fazendas. Os veterinários devem garantir que o uso desse fármaco atinja a doença clínica, considerando a redução de seu uso sempre que possível (RHOUMA *et al.*, 2016). Outra medida importante é a realização de gestão biológica do estrume. Pesquisadores relataram que a compostagem elimina em média 50% a 70% de alguns antimicrobianos utilizados em suínos (RHOUMA *et al.*, 2016).

2.8 Vigilância e controle

Evidências científicas demonstraram uma diminuição consistente na frequência de resistência antimicrobiana em bactérias isoladas de animais e seres humanos, após restrições ao uso de antibióticos de importância médica em animais para consumo humano (AIDARAKANE *et al.*, 2018). Além disso, a manutenção de boas práticas de higiene nos hospitais, na população geral, autocuidado, higiene de áreas públicas relacionadas como estações do metrô, ônibus e outros perto dos hospitais são recomendados para salvaguarda a saúde e seguridade do ambiente (ZHANG *et al.*, 2021).

Os esforços para implementação de vigilância e controle de ORAs (organismos resistentes aos antibióticos) pela OMS, são insuficientes para conhecer o verdadeiro ônus desses microrganismos e mitigar o problema global. Um exemplo disso é a falta de amostras representativas nos países estudados levando ao conhecimento parcial da situação atual. O

problema provavelmente surge como resultado da falta de mecanismos adequados por parte dos governos para estabelecer colaborações efetivas para o monitoramento e controle dos ORAs entre os países da região, o que permite uma estratégia com abordagem global. A prioridade é garantir o estabelecimento de mecanismos adequados de monitoramento, permitir o desenvolvimento de uma vigilância sentinela e de um relatório oportuno para a tomada de ações apropriadas (ROCHA *et al.*, 2015).

Uma abordagem de Saúde Única visando diminuir o consumo de todos os antibióticos é o objetivo para proteger a segurança alimentar, de forma a eliminar gradualmente o uso desses medicamentos. No entanto, antibióticos críticos para uso humano como colistina, deve ser protegido por interrupção imediata do uso em animais. Em termos de dosagem, doses altas de até 720 mg por dia são empregados. Entretanto, a subdosagem de colistina em pacientes com doença crítica, queimaduras, insuficiência renal e obesidade leva ao risco de surgir resistência (AL-TAWFIQ *et al.*, 2017).

Finalmente, uma abordagem de Saúde Única para controlar a RAM requer o estabelecimento, manutenção, e expansão de componentes colaborativos científicos, programáticos e a formulação de políticas que incorporem explicitamente os conhecimentos científicos que envolvam profissionais de medicina humana e veterinária, estudos ambientais, microbiologia, farmacologia, demais participantes nos cuidados da saúde, agricultura e na cadeia global de suprimento de alimentos e finalmente consumidores (SOLOMON, 2017). Pesquisa e desenvolvimento são necessários em medicina alternativa, juntamente com legislações rígidas tanto em nível nacional como internacional. A disseminação de bactérias resistentes do ambiente da aquicultura está emergindo, por tanto requer atenção urgente (ZHANG *et al.*, 2021).

3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Atualmente, a OMS e a OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) não medem esforços para reduzir o problema da resistência bacteriana aos antibióticos. Uma vez que a pressão seletiva exercida pelo uso desses medicamentos, faz com que microrganismos gerem diversos mecanismos de resistência antimicrobiana e, nessa ordem de ideias, o quadro não é encorajador no campo da terapia médica em geral. Sobre o conceito de “Saúde Única”, considerações são conduzidas para a proteção dos seres humanos e animais frente a patógenos na interface: humano, animal e meio ambiente.

Dessa forma, esta pesquisa se justifica pela necessidade de gerar um avanço no conhecimento da propagação do gene *mcr*, uma vez que pouco se sabe da frequência desse padrão de resistência antimicrobiana no nosso país, e menos ainda no nosso Estado, podendo esses dados levar a implementação de medidas visando impedir a disseminação desses microrganismos multidroga resistentes e estabelecer estratégias para o controle da resistência à colistina na nossa região.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Detectar e caracterizar a presença do gene *mcr* responsável pela resistência à colistina em enterobactérias isoladas de seres humanos, animais, amostras ambientais de água e alimentos em Sobral - CE numa abordagem de “Saúde Única”.

4.2 Objetivos específicos

- a. Identificação bioquímica e análise do perfil de sensibilidade aos antibióticos de enterobactérias isoladas de infecções nosocomiais, de animais, de água ambiental e de alimentos;
- b. Verificar a ocorrência dos genes *mcr-1* e *mcr-2* em enterobactérias isoladas de amostras humanas, de animais, de alimentos e ambientais pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- c. Avaliar o perfil de sensibilidade à colistina de enterobactérias com os genes *mcr-1* e *mcr-2* isoladas de amostras humanas, de animais, ambientais e de alimentos pelo método de Microdiluição em Caldo (BMD).

5 METODOLOGIA

5.1 Tipo de pesquisa

É uma pesquisa aplicada de abordagem quantitativa e do tipo experimental com objetivo de detectar e caracterizar por métodos moleculares a presença do gene *mcr* e suas variantes junto com a expressão do padrão de resistência à colistina em enterobactérias isoladas de seres humanos, animais, ambientes e alimento.

5.2 Aspectos éticos

Para atender aos aspectos éticos da pesquisa envolvendo seres humanos e partindo de compreensão que para o desenvolvimento de estudos em saúde requer rigor metodológico e ético, a pesquisa foi orientada conforme a resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que estabelece as normas e diretrizes de pesquisa em seres humanos. Foram obedecidos os princípios éticos do respeito pela pessoa (autonomia e proteção de grupos vulneráveis), beneficência, não maleficência e justiça. Dessa forma, a pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Vale do Acaraú e obteve Parecer aprovado (CEP/UVA Nº 4.206.357) – Anexo A.

5.3 Materiais e métodos

5.3.1 Isolados bacterianos

Foram analisados 66 (sessenta e seis) isolados de diferentes origens, sendo de origem humana (n=30), animal (n=19), amostras do ambiente (água) (n=5) e alimentos (queijo) (n=12). Vale ressaltar que as cepas bacterianas que foram analisadas são oriundas de coleções biológicas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Ceará (UFC)/*Campus* Sobral e do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA). Os microrganismos foram mantidos em freezer -80°C em meio BHI com glicerol 15%.

5.3.1.1 Isolados de infecções humanas

Um total de trinta e seis bacilos entéricos isolados de infecções nosocomiais que fazem parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da UFC/*Campus*

Sobral foram analisados. Esses microrganismos foram coletados em 2015 e identificados pelo método automatizado VITEK 2®.

5.3.1.2 Isolados de animais

Um total de dezenove isolados de aves de granja coletadas no ano 2020, previamente identificados como *E. coli* no Laboratório de Microbiologia da UVA.

5.3.1.3 Isolados de Ambientes (águas)

Um total de vinte e um isolados de recursos hídricos da região do Norte do Ceará (amostras de água) coletados no período de 2017-2018 foram identificados como *E. coli*.

5.3.1.4 Isolados de Alimentos (queijo)

Um total de doze isolados de queijo coletados no período de 2017-2018 foram identificados como cepas de *E. coli*.

5.3.1.5 Isolados de Ambientes (solo)

Um total de oito isolados do solo previamente identificados como *E. coli*, foram reativados no mês de setembro de 2020, mas nenhum estava viável e, portanto, não puderam ser analisados nesse estudo.

A coleta de todas as amostras foi feita de acordo com a metodologia padronizada de coleta para amostras clínicas de humanos, animais, águas e alimentos.

5.3.2 Reativação dos isolados bacterianos, confirmação da identidade bioquímica e análise do perfil de sensibilidade

A reativação dos espécimes armazenados em freezer -80°C foi realizada acrescentando-se uma alíquota 50µl da cultura em glicerol em um tubo de ensaio contendo 5,0 mL de caldo BHI (Himedia®, Mumbai, Índia) e mantido em estufa bacteriológica por 18 horas a 37°C, um tubo para cada amostra e mais um tubo de controle negativo. Após crescimento, o inóculo foi semeado em placa com Ágar MacConkey (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) utilizando-se uma alça bacteriológica estéril e colocado em estufa novamente a 37°C, por 24h, juntamente com uma placa sem semeadura como controle negativo de contaminação dos meios ou da própria estufa. Após crescimento, foi confirmada a pureza da amostra com a observação das características morfo-tintoriais através da coloração de Gram.

Todos os isolados de infecções humanas tiveram suas identidades bioquímicas confirmadas e o perfil de sensibilidade antimicrobiano analisado através do sistema automatizado VITEK 2® (BioMérieux, France) (Figuras 6 e 7) disponível na cidade de Sobral, que fornece identificação rápida e de acurácia para mais de 350 bactérias e leveduras clinicamente relevantes dentro de cartões descartáveis.

Figura 6- Sistema automatizado VITEK2®

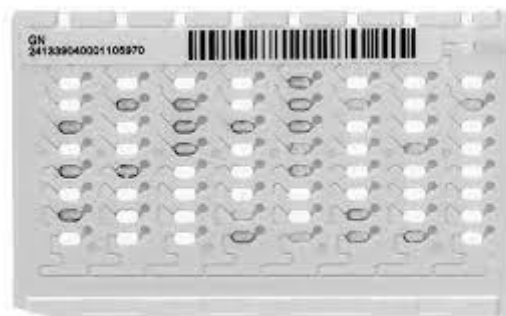


Fonte: <https://www.biomerieux.com.co/diagnostico-clinico/tarjetas-vitek-2-id>

Os isolados nosocomiais foram cultivados em Agar MacConkey e incubados a 35°C durante 24 horas. Após crescimento bacteriano, foi realizado o preparo padronizado da suspensão bacteriana e o inóculo foi introduzido no equipamento através de um micro tubulação por aspiração (sem a necessidade de inoculação manual), dando-se início aos ensaios. Para análise da sensibilidade antimicrobiana, a suspensão foi automaticamente dirigida para um cartão plástico fechado com 64 poços contendo concentrações específicas de antimicrobianos liofilizados. Os cartões foram incubados em um compartimento de temperatura controlada (35°C ± 1), sendo a leitura do crescimento bacteriano realizada a cada 15 minutos por fotometria, através de medidas turbidimétricas do crescimento bacteriano. Assim, foi medida a quantidade de luz transmitida através de cada poço, incluindo o poço de controle de crescimento. Estes cartões permitem que seja disponibilizado o resultado de

Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a maioria das bactérias aeróbicas de crescimento rápido, em um período de 4 a 18 horas. O VITEK 2® compact possui *software* específico que emite relatório das análises no menor tempo possível (<https://www.biomerieux.com.co/diagnostico-clinico/tarjetas-vitek2-id>).

Figura 7 – Cartão para identificação de bactérias pelo VITEK 2® 2 GN ID



Fonte: <https://www.biomerieux.com.co/diagnostico-clinico/tarjetas-vitek2-id>

Para os isolados de animais, ambientes e alimentos foi feita a identificação bioquímica pelos métodos convencionais na UVA.

5.3.3 Extração do DNA plasmidial

Para a análise molecular, todos os isolados provenientes de amostras clínicas de humanos, animais, alimentos e água foram submetidos ao método padrão de lise alcalina para extração do DNA plasmidial. Foi feito pelo método Miniprep modificado pelo Rahul Patharkar (PATHARKAR, 2018). Para a extração foi usada a solução 1 (10 mM EDTA pH 8.0), solução 2 (0.1 M NaOH, 1% SDS) e a solução 3 (250g/L de Acetato de Potássio, 15% vol/vol Ácido Acético). Todas as soluções foram armazenadas à temperatura ambiente no Laboratório do Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS).

As bactérias foram crescidas no caldo BHI (24 horas) e transferidas (2 mL) para o microtubo, após foram submetidas à centrifugação (10.000 g / 3 min) e foi descartado o sobrenadante. O pellet foi ressuspenso em 100 µl da solução 1 pelo vortex. Após, foi colocado 200 µl da solução 2 e foi misturado suavemente e finalmente foi adicionado 75 µl da solução 3 e misturado por inversão. Quando o precipitado branco ficou no microtubo, foi colocado no freezer (-20°C) por um minuto. Após esse tempo foi submetido à centrifugação máxima por 5

min (10.000 g). Um total de 375 µl do material lisado foi transferido para outro microtubo e mais 225 µl de isopropanol foi misturado por inversão. A mistura foi centrifugada 5 min (10.000 g) e o sobrenadante foi descartado por decantação. O pellet que ficou no microtubo foi lavado com 1 mL de etanol a 70% (misturado 4 a 5 vezes) e posteriormente centrifugado 30 s (10.000 g). O etanol foi descartado e o material foi submetido de novo à centrifugação por 10 s (10.000 g), o resíduo do etanol foi eliminado com ajuda de uma micropipeta. Os microtubos ficaram abertos por 10 min. Finalmente, foi aliquoteado em microtubos estéreis mais 100 µl buffer TE (Tris:EDTA 10:1) e levado para o freezer para a posterior quantificação e avaliação de qualidade pela eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com Brometo de Etídio.

5.3.4 Quantificação do DNA plasmidial

A quantificação foi feita com longitude de onda de 320 nm. com 2 µl de material genético mais 98 µl de buffer TE no espectrofotômetro UV/Vis reader de Genequant pro de Amersham Biosciences, EE.UU.

5.3.5 Análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene *mcr-1* e *mcr-2*

Os genes foram amplificados usando iniciadores específicos (Integrated DNA Technologies®) para os genes *mcr-1* e *mcr-2* (Tabela 1), por PCR convencional, e as condições de ciclagem utilizadas foram as seguintes: desnaturação (1 ciclo) a 94°C por 5 min, desnaturação (35 ciclos) a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s, alongamento inicial a 72°C por 30 s e ciclo de extensão final a 72°C por 5 min (Tabela 2). Os parâmetros foram avaliados e unificados para as duas reações. Adaptado do Laboratório de Referência da União Europeia. (CAVACO *et al.*, 2016). Cada reação (para *mcr-1* e *mcr-2*) consistiu em 12,5 µl de Taq Pol – Master mix (2X) Green (Cellco®), 7,5 µl de água ultrapura, 2,0 µl do primer F, 2,0 µl do primer R e 1 µl do DNA plasmidial e o preparo da diluição dos primers consistiu em 5 µl da solução mãe e 95 µl de água ultrapura. As reações de PCR foram realizadas para o gene *mcr-1* e *mcr-2* nos sessenta e seis (66) isolados e para cepas padrão *mcr-1* e *mcr-2* obtidas do Instituto Fio Cruz como controle positivo e água ultrapura como controle negativo, as reações foram feitas no termociclador Amplitherm® TX96 Plus no laboratório do NUBIS da UFC/Sobral.

Posteriormente, foi feita a corrida eletroforética com tempo inicial de 5 min (90 mA e 220 V) e a corrida geral por 55 min (90mA e 220V). Os resultados da região

amplificada foram visualizados pela Eletroforese em gel de Agarose a 1,0% corado com Brometo de Etídio (HAMEED *et al.*, 2019) no transiluminador de géis (365 nm) (Enduro™ GDS Touch). Cepas padrão do gene *mcr-1* e *mcr-2* foram usadas na realização da PCR e corrida eletroforética. O marcador de peso molecular usado foi de 100bp (Solis BioDyne DNA ladder) que contem 13 bandas discretas de fragmentos de DNA com tamanho de fragmentos que vão de 100 bp até 3.000 bp.

Tabela 1 – Iniciadores ou primers usados para amplificação por PCR dos genes *mcr*

Gene alvo	Sequências de nucleotídeos 5'→3'	Nº de Bases	Fonte
<i>mcr-1</i>	<i>mcr-1</i> -F: CGGTCAGTCCGTTTGTTTC	18	Liu <i>et al.</i> , 2016
	<i>mcr-1</i> -R: CTTGGTCGGTCTGTAGGG	18	Rebelo <i>et al.</i> , 2018
<i>mcr-2</i>	<i>mcr-2</i> -F: TGTTGCTTGTGCCGATTGGA	21	Integrated DNA
	<i>mcr-2</i> -R: AGATGGTATTGTTGGTTGCTG	20	technologies®

Fonte: Elaboração própria, 2021.

Tabela 2 – Condições de ciclagem usados na reação do PCR para os genes *mcr-1* e *mcr-2*

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclo
Desnaturação inicial	94	5 min	1
Desnaturação	94	30 s	35
Anelamento	55	30 s	35
Alongamento inicial	72	30 s	35
Extensão	72	5 min	1

Fonte: Elaboração própria, 2021.

5.3.6 Teste de Concentração Mínima Inibitória (CIM) à colistina pelo método de Microdiluição em Caldo (BMD)

Para os isolados com a presença do gene *mcr* foi realizado a CIM pelo método padrão ouro, microdiluição em caldo (BMD), usando sulfato de colistina em pó (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) (HAMEED *et al.*, 2019; OSEI SEKYERE, 2019; KAR *et al.*, 2021) de acordo com o *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) do 2020 para avaliação da sensibilidade *in vitro* ao referido antimicrobiano.

5.3.6.1 Preparo da solução do antibiótico

Para o preparo da solução do antibiótico foi usada a fórmula para obter o volume da solução padrão (SP)/mL, baseada na pesagem do antibiótico (mg) pela potência do antibiótico ($\mu\text{g}/\text{mg}$) sobre a concentração do SP ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Foi feita a pesagem de 15,05 mg de sulfato de colistina e adicionado 950 μl de água ultrapura de qualidade Milli-Q®. O peso do antibiótico foi feito na balança calibrada com precisão igual ou superior para um décimo de miligrama. No caso da colistina a potência vem expressada em UI/mg onde 1 UI tem equivalência a 0,0332 μg , assim a potência fica em $\mu\text{g}/\text{mg}$ para fazer a pesagem do antibiótico.

5.3.6.2. Preparo e armazenamento da solução de colistina

A solução do antibiótico foi preparada numa concentração que duplique a desejada. O antibiótico foi armazenado numa garrafinha da cor âmbar e posteriormente foi coberta com papel alumínio para conservação no freezer -4°C .

5.3.6.3. Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo foi feito ajuste para uma turbidez semelhante à da escala 0,5 de Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), realizando-se diluição 10^{-2} da suspensão bacteriana em CAMHB com concentrações finais de 20 a 25 mg de Ca^{++}/L y 10 a 12,5 mg de Mg^{++}/L . Após 15 min, foi inoculado 25 μL do inóculo diluído em cada poço da policubeta usando pipeta automática multicanal. Dessa forma o volume final em cada poço foi de 50 μl : 25 do antibiótico + 25 μl do inóculo bacteriano. Foi fechada a placa com a tampa e foi incubada na estufa a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 20 – 24 hrs.

5.3.6.4 Leitura dos resultados

Foi lida a menor concentração de antibiótico que conseguiu inibir completamente o crescimento bacteriano no poço da microdiluição, definida pela leitura visual e espectrometria com o leitor de ELISA (Bio Trak II – Plate Reader) com absorvância de 620nm. Pontos de corte utilizados para a interpretação dos resultados para Colistina e Polimixina B (CLSI MR01 2020 - *Polymyxin Breakpoints for Enterobacterales, P. aeruginosa and Acinetobacter spp.*) foram utilizados para interpretação dos resultados (Intermediário ≤ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Resistente ≥ 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (CLSI, 2020).

Foram utilizadas cepas controle da Coleção de Cultura do Tipo Americano (ATCC) de *E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 700603 para o controle de qualidade

dos experimentos e foi feita a microdiluição por triplicata para cada isolado e cepa ATCC.

5.3.6.5 Descarte de material e Sulfato de colistina

Tendo em conta o objetivo deste estudo junto com a emergência da disseminação do gene *mcr* em diferentes fontes como nas águas do ambiente, o descarte do material que teve contato com o antibiótico e o próprio antibiótico (sulfato de colistina) foi feito num recipiente com solução oxidante (Hipoclorito de sódio mais Hidróxido de potássio) durante 1 dia para a desnaturalização da molécula, após o material e o recipiente foram autoclavados.

5.4 Análise dos prontuários

Para os isolados de amostras clínicas de pacientes humanos que albergavam o gene *mcr* foi realizada a consulta dos laudos, com o objetivo de levantar os dados clínicos dos perfis de sensibilidade para a colistina junto com os perfis para outros antibióticos para estudar possíveis relações do gene *mcr* junto com outras resistências.

5.5 Análise estatística

A análise estatística para a avaliação quantitativa sobre as frequências encontradas dos genes *mcr* foi realizada através do teste do Qui-Quadrado e tabelas de contingência (Software SPSS® IBM Company – V 19). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e o intervalo de confiança utilizado para avaliação do risco relativo for de 95%.

5.6 Biossegurança

Os Laboratórios de Microbiologia e Parasitologia, Biologia Molecular e Imunologia (NUBIS) e Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará em Sobral dispõem de todas as condições físicas e equipamentos de proteção coletiva e individual para a manipulação de microrganismos (NB-2).

6 RESULTADOS

6.1 Isolados bacterianos

6.1.1 Isolados de infecções humanas

No mês de fevereiro de 2020 foram reativados em caldo BHI, posteriormente foi feita a confirmação bioquímica e verificação das características morfo-tintoriais dos espécimes. Desse total, apenas 31 (86,1%) estavam viáveis, mas um desses isolados foi identificado como *Proteus mirabilis* pelo método VITEK 2®. Após confirmação da identidade desse microrganismo no laboratório de microbiologia através de provas bioquímicas, o mesmo não foi incluído para análise, uma vez que *P. mirabilis* tem resistência natural à colistina. Portanto, os isolados viáveis analisados corresponderam a trinta, sendo 16 (53,3%) da espécie *K. pneumoniae* e 14 (46,7%) de *E. coli*.

6.1.2 Isolados de animais

Os isolados foram reativados no mês de setembro de 2020 em caldo BHI. Posteriormente, foi feita verificação de suas características morfo-tintoriais e confirmação da identidade por testes bioquímicos no Laboratório de Microbiologia da UFC/Sobral.

6.1.3 Isolados de Ambientes (águas)

No mês de setembro de 2020 foi feita a reativação desses microrganismos em caldo BHI, verificação de suas características morfo-tintoriais e confirmação bioquímica da identidade dos mesmos no Laboratório de Microbiologia da UFC/Sobral. Desse total, somente 5 (23,8%) estavam viáveis e foram utilizados nessa pesquisa.

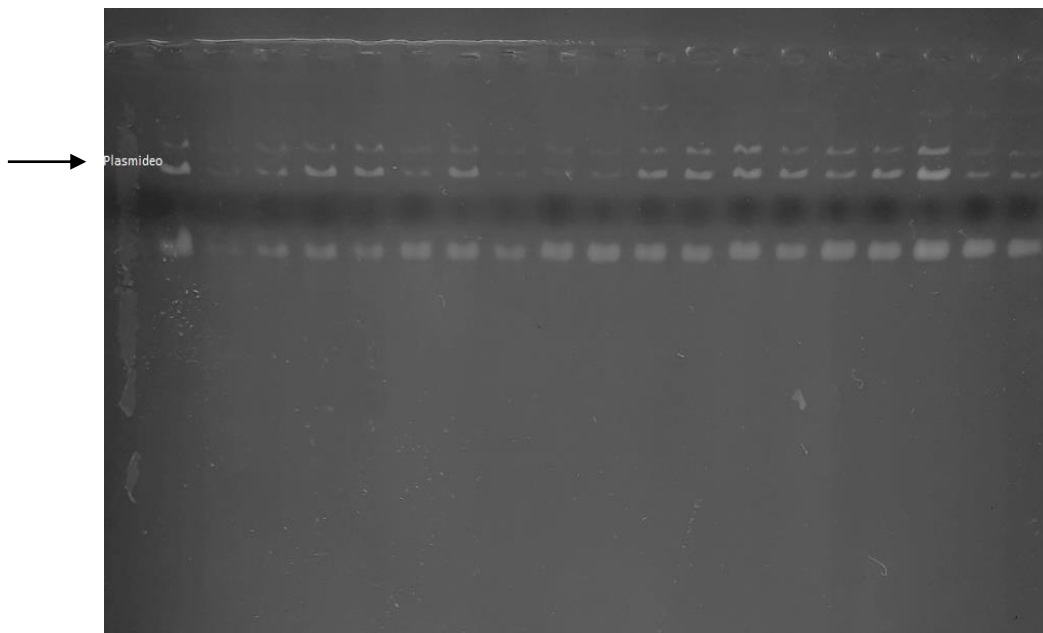
6.1.4 Isolados de Alimentos (queijo)

No mês de setembro de 2020 foi feita a reativação em caldo BHI com a posterior confirmação bioquímica e das características morfo-tintoriais dessas cepas.

6.2 Extração do DNA plasmidial

Após extração do DNA plasmidial dos espécimes, foi realizada corrida eletroforética em gel de agarose para avaliação do DNA extraído. O gel foi revelado no transiluminador de géis (365 nm) (Enduro™ GDS Touch) (Figura 8).

Figura 8 - Gel de agarose com bandas que corresponderam com o plasmídeo

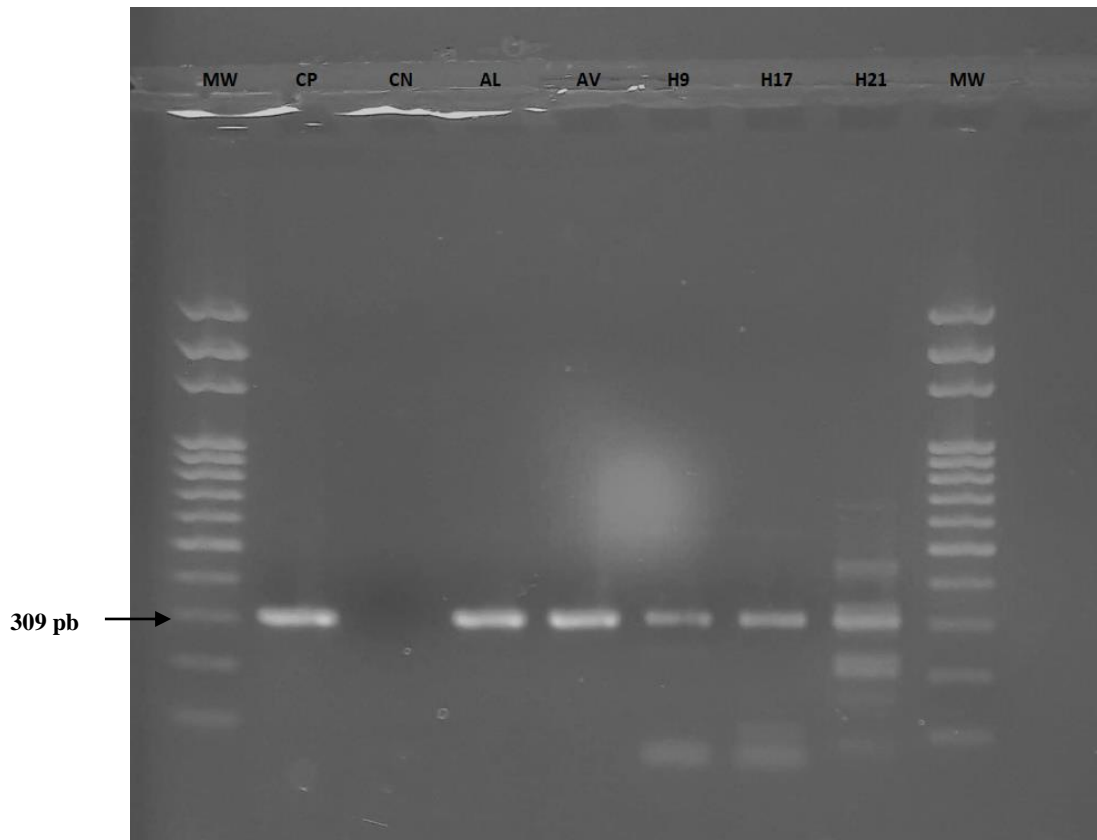


Fonte: Registro fotográfico próprio, 2021.

6.3 Análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene *mcr-1* e *mcr-2*

Foi realizada a PCR para o gene *mcr-1* e *mcr-2* para as sessenta e seis amostras viáveis. O tamanho do amplicon para *mcr-1* é de 309 pb e para o *mcr-2* 567 pb (CAVACO *et al.*, 2016). Após corrida eletroforética foi realizada leitura das bandas, sendo que 5 (7,6%) isolados foram positivos para a presença do gene *mcr-1* com a respectiva banda de amplificação (Figura 9) e a origem e identificação dos isolados mostrados na tabela 3.

Figura 9 – Fotos de gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela PCR realizada para a detecção do gene *mcr-1*. MW: Marcador de peso molecular, CP: controle positivo/cepa padrão (309 pb gene *mcr-1*), CN: Controle negativo/água ultrapura estéril, AL: Isolado de alimento, AV: Isolado de ave, H9: Isolado de infecção nosocomial No. 9, H17: Isolado de infecção nosocomial No. 17, H21: Isolado de infecção nosocomial No. 21.



Fonte: Registro fotográfico próprio, 2021.

Tabela 3 – Origem das amostras positivas para a presença do gene *mcr-1*

Origem	Isolados com <i>mcr-1</i>	Microrganismo
Humana	3	<i>K. pneumoniae</i>
Animal	1	<i>E. coli</i>
Alimento	1	<i>E. coli</i>

Fonte: Elaboração própria, 2021

Além disso foram estudados os laudos dos pacientes (isolados humanos) com a presença do gene *mcr-1* para caracterização e determinação do perfil de sensibilidade desses microrganismos. Os resultados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização e perfil de sensibilidade dos isolados humanos positivos para o gene *mcr-1*

Origem	Amostra	Microrganismo	MIC Colistina VITEK 2®	Teste de sensibilidade antimicrobiana	Idade/ Gênero
Humana No. 9 (12.3881 6-4)	Lavado Brônquico	<i>K. pneumoniae</i>	Susceptível = < 0,5	AMK: S, AMP: R, AMS: R, FEP: R, FOX: R, CAZ: R, CRO: R, CXM: R, CIP: R, COL: S , ETP: S, GEN: R, IPM: S, MEM: S, TZP: I, TGC: S, ESBL: POSITIVO	71/F
Humana No. 17 (5900.00 22.3912)	Fragmento de Tecido	<i>K. pneumoniae</i>	Susceptível = < 0.5	AMK: S, AMP: R, AMS: R, FEP: R, FOX: I, CAZ: R, CRO: R, CXM: R, CIP: R, COL: S , ETP: S, GEN: S, IPM: S, MEM: S, TZP: R, TGC: S, ESBL: POSITIVO	64/M
Humana No. 21 (5900.00 22.3912)	Fragmento de Tecido	<i>K. pneumoniae</i>	Susceptível = < 0.5	AMK: S, AMP: R, AMS: R, FEP: R, FOX: R, CAZ: R, CRO: R, CXM: R, CIP: R, COL: S , ETP: S, GEN: R, IPM: S, MEM: S, TZP: R, TGC: S, ESBL: POSITIVO	67/F

AMK: Amicacina, **AMP:** Ampicilina, **AMS:** Ampicilina/Sulbactam, **FEP:** Cefepima, **FOX:** Cefoxitina, **CAZ:** Ceftazidima, **CRO:** Ceftriaxona, **CXM:** Cefuroxima, **CIP:** Ciprofloxacina, **COL:** Colistina, **ETP:** Ertapenem, **GEN:** Gentamicina, **IPM:** Imipenem, **MEM:** Meropenem, **TZP:** Piperacilina/Tazobactam, **TGC:** Tigeciclina, **ESBL:** Betalactamase de espectro estendido.

Fonte: Elaboração própria, 2021.

Todos os isolados nosocomiais que albergavam o gene *mcr-1* foram sensíveis à colistina pelo método automatizado VITEK 2®. Contudo, apresentaram um perfil de resistência variável a outros agentes antimicrobianos e foram produtoras de β-lactamase de espectro estendido (ESBL) (Tabela 4).

6.4 Teste de susceptibilidade à colistina pelo método de Microdiluição em Caldo (BMD)

Foi realizado o método padrão ouro (Microdiluição em caldo) com ajuste de cátiões de acordo com o *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) para isolados que albergavam o gene *mcr-1*. O teste foi feito em triplicata para cada isolado e para a cepa controle (*E. coli* ATCC 25922). Os resultados são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Resultado da CIM pelo método BMD para Sulfato de Colistina dos isolados *mcr-1* positivos

Isolado	CIM µg/mL	Perfil (segundo CLSI, 2020)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,25	
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,25	
<i>K. pneumoniae</i> Humana No. 9	< 0,25	Intermediário
<i>K. pneumoniae</i> Humana No. 17	< 0,25	Intermediário
<i>K. pneumoniae</i> Humana No. 21	< 0,25	Intermediário
<i>E. coli</i> Animal No. 38	4	Resistente
<i>E. coli</i> Alimento No. 57	4	Resistente

Fonte: Elaboração própria, 2021.

Nesse estudo, o gene *mcr-1* foi detectado em 3/30 (10%) isolados de origem humana, 1/19 (5,3%) de origem animal (ave de granja) e 1/12 (8,3%) de alimento (queijo) (Tabela 6). Contudo, nenhum dos espécimes albergava o gene *mcr-2*. O teste de microdiluição em caldo revelou que das amostras positivas para o gene *mcr-1*, 3/5 (60%) apresentaram perfil intermediário com CIM menor do que 0,25 µg/mL e corresponderam aos isolados de infecções nosocomiais e 2/5 (40%) apresentaram um perfil de resistência à colistina com CIM de 4 µg/mL que corresponderam aos isolados de ave e de queijo (Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9).

Tabela 6 – Frequências do gene *mcr-1* segundo a origem

			<i>mcr-1</i>		Total
			Negativo	Positivo	
Origem	Água	Contagem	5	0	5
		% dentro de Origem	100,0%	0,0%	100,0%
	Alimento	Contagem	11	1	12
		% dentro de Origem	91,7%	8,3%	100,0%
	Animal	Contagem	18	1	19
		% dentro de Origem	94,7%	5,3%	100,0%
	Humana	Contagem	27	3	30
		% dentro de Origem	90,0%	10,0%	100,0%
Total	Contagem		61	5	66
	% dentro de Origem		92,4%	7,6%	100,0%

Fonte: Software SPSS® IBM Company – V 19. Elaboração própria, 2021.

Tabela 7 – Frequências dos isolados positivos para *mcr-1* com perfil intermediário à colistina pelo BMD

			Intermediário		Total
			Não	Sim	
<i>mcr-1</i>	Negativo	Contagem	61	0	61
		Contagem esperada	58,2	2,8	61,0
		% entre <i>mcr-1</i>	100,0%	0,0%	100,0%
	Positivo	Contagem	2	3	5
		Contagem esperada	4,8	,2	5,0
		% entre <i>mcr-1</i>	40,0%	60,0%	100,0%
Total	Contagem		63	3	66
	Contagem esperada		63,0	3,0	66,0
	% entre <i>mcr-1</i>		95,5%	4,5%	100,0%

Fonte: Software SPSS® IBM Company – V 19. Elaboração própria, 2021.

Após a análise estatística, mediante tabelas de contingência e teste Qui-quadrado, foi verificado que a presença do gene *mcr-1* nas amostras de seres humanos é independente da expressão do fenótipo de resistência (Tabela 8), porém a presença do gene *mcr-1* nos isolados de animais e alimento está relacionada com a expressão do fenótipo de resistência ($p < 0,05$) como pode ser observado nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 8 – Teste Qui-Quadrado para o CIM perfil intermediário

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-lados)	Exact Sig. (2-lados)	Exact Sig. (1-lado)
Pearson Qui-Quadrado	38,343 ^a	1	0,000		
Correção de continuidade	25,761	1	0,000		
Razão de Verossimilhança	17,678	1	0,000		
Teste Exato de Fisher				0,000	0,000
N de casos validos	66				

a. 3 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 0,23.

b. Computed only for a 2x2 table

Fonte: Software SPSS® IBM Company – V 19. Elaboração própria, 2021.

Tabela 9 – Frequências dos isolados positivos para *mcr-1* com perfil de resistência à colistina pelo BMD

			Resistente		Total
			Não	Sim	
<i>mcr-1</i>	Negativo	Contagem	61	0	61
		Contagem esperada	59,2	1,8	61,0
		% entre <i>mcr-1</i>	100,0%	0,0%	100,0%
	Positivo	Contagem	3	2	5
		Contagem esperada	4,8	,2	5,0
		% within <i>mcr-1</i>	60,0%	40,0%	100,0%
Total	Contagem	64	2	66	
	Contagem esperada	64,0	2,0	66,0	
	% within <i>mcr-1</i>	97,0%	3,0%	100,0%	

Fonte: Software SPSS® IBM Company – V 19. Elaboração própria, 2021.

Tabela 10 – Teste do Qui-Quadrado para o CIM perfil resistente

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-lados)	Exact Sig. (2-lados)	Exact Sig. (1-lado)
Pearson Qui-Quadrado	25,162 ^a	1	0,000		
Correção de continuidade ^b	13,391	1	0,000		
Razão de Verossimilhança	11,195	1	0,001		
Teste Exato de Fisher				0,005	0,005
N de casos validos	66				

a. 3 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 0,15.

b. Computed only for a 2x2 table

Fonte: Software SPSS® IBM Company – V 19. Elaboração própria, 2021.

7 DISCUSSÃO

A resistência transmissível à colistina mediada por plasmídeo é um achado de importância global, desse modo na atualidade a resistência de cepas isoladas de diferentes origens com o gene *mcr* tem grande importância. O gene *mcr* codifica proteínas transmembranas citoplasmáticas de bactérias gram negativas, gerando resistência para o antibiótico colistina. Assim, a maioria dos estudos demonstra que os seres humanos e animais estão colonizados por microrganismos comensais e patógenos com resistência à colistina (ANYANWU *et al.*, 2020). A presença do gene *mcr-1* tem sido reportada em muitos países da América do Sul em amostras de humanos, animais e alimentos (MONTE *et al.*, 2017; YAURI-CONDOR *et al.*, 2020), além disso a ampla diversidade da América Latina remonta muitos desafios em relação à epidemiologia das doenças em geral e da resistência aos antimicrobianos, tendo em conta variáveis como a geografia, o clima e a diversidade biológica (RAMON-PARDO *et al.*, 2018).

Neste estudo foi detectada a presença do gene *mcr-1* em amostras clínicas de humanos, de animais e de alimentos que procedem de animais (queijo). Vale ressaltar que foram seguidas as recomendações da OMS, OPS, OIE que estimulam pesquisas com uma abordagem de Saúde Única no intuito de que possam fornecer indicadores epidemiológicos desse problema.

As bactérias resistentes que têm origem em seres humanos, animais e nos ambientes podem se propagar de um país para outro (RAMON-PARDO *et al.*, 2018). Assim sendo, o gene *mcr-1* foi detectado no Brasil pela primeira vez no ano 2016, num estudo retrospectivo com amostras do ano 2000 até 2016 procedentes de animais, alimento para animais, ambientes, alimentos derivados de animais e de seres humanos (FERNANDES *et al.*, 2016), os achados deste estudo confirmaram a presença do gene *mcr* nesta ampla listagem de fontes, e de fato o Brasil é o país da América Latina com o maior número de dados reportados de bactérias *mcr*-positivas (ROCHA *et al.*, 2019).

Nessa pesquisa, verificou-se que as bactérias de origem humana, animal e alimento proveniente de animais que albergavam o gene *mcr-1* eram *E. coli* e *K. pneumoniae*. Um dos primeiros achados que suportou essa observação foi o estudo retrospectivo de prevalência do gene *mcr-1* em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* coletados em 2011 – 2014 na China que demonstraram a presença do gene *mcr-1* em 78 (15%) de 525 amostras de carne crua, 166 (21%) de 804 amostras de animais e 16 (1%) de 1.322 amostras de humanos

hospitalizados com infecções (LIU *et al.*, 2016), observando-se um menor percentual da presença do gene nas amostras de seres humanos do que a encontrada na nossa pesquisa (10%). Esse dado poderia ser explicado pelo fato de eles terem analisado um número bem maior de isolados e também porque possivelmente as amostras foram coletadas em anos anteriores em comparação ao nosso estudo. Após essa primeira descrição, o gene *mcr-1* tem sido amplamente observado em todo o mundo em isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Salmonella* spp. provenientes de animais, ambientes e seres humanos (AL-TAWFIQ *et al.*, 2017; WHO, 2018).

O primeiro relato da ocorrência do gene *mcr* em isolados de *E. coli* foi em seres humanos, mas de amostras clínicas de origem hospitalar (RAPOPORT *et al.*, 2016), achado esse importante porque neste estudo as cepas de *K. pneumoniae* isoladas de amostras clínicas eram oriundas de infecções nosocomiais, embora esses microrganismos tivessem apresentado sensibilidade à colistina pelo método automatizado VITEK 2®, nesse caso pode ser que as bactérias não tivessem expressando a resistência a esse antimicrobiano por não haver um uso excessivo desse antibiótico no hospital onde as mesmas foram coletadas, ou ainda porque esse método automatizado (VITEK 2®) funciona como um *screening*, não podendo definir com um alto grau de sensibilidade e especificidade, ou discriminar se tem resistência transferível para o *mcr* ou resistência a outros antimicrobianos como a tigeciclina, como relatado em outro estudo do nosso grupo de pesquisa (ROCHA *et al.*, 2019).

Na revisão de Osei Sekyere em 2019 foi comparada e avaliada a eficiência de sistemas comerciais automatizados: Microscan, MICRONAUT-S, BD Phoenix (Phoenix 100™), Sensititre e VITEK 2®. No caso do VITEK 2® método usado para a avaliação do perfil de sensibilidade inicialmente neste estudo, foi o método que teve a mais baixa sensibilidade (42,9%) para o gene *mcr-1*, além disso, é um método que tem ainda maior custo do que outras metodologias. Podendo, como dito anteriormente, ser essa a explicação para o perfil de sensibilidade à colistina dos três isolados nosocomiais de *K. pneumoniae mcr +* observado nos laudos hospitalares, ou seja, é um método que não oferece boa sensibilidade para a colistina, podendo fornecer resultados de falsa sensibilidade (OSEI SEKYERE, 2019; ROCHA *et al.*, 2019). Por isso, realizou-se também neste estudo o método padrão ouro, BMD, para certificar-se do perfil de sensibilidade à colistina.

O gene *mcr* presente em isolados de *E.coli* na amostra de ave e de queijo, corrobora os achados de Fernandes *et al.* (2016) onde foi reportada *E. coli* positiva para *mcr-1* de alimentos que procedem de animais gerando uma conexão entre o uso que houve de

polimixinas junto com a resistência observada. Saidenberg *et al.* (2020) relataram que 6/64 (9,37%) de *E. coli* isoladas de aves no Brasil albergavam o gene *mcr-1* e apresentavam também resistência a outros antibióticos, denotando um perfil de multidroga resistência (MDR), sendo quase o dobro dos achados neste estudo. Contudo, a informação do ano em que as amostras foram coletadas é desconhecida, dificultando dessa forma uma comparação entre os achados. Na Argentina também foi detectado o gene *mcr-1* em pelo menos um terço de 152 isolados de *E. coli* recuperados de aves entre 2013 e 2017 (DOMINGUEZ *et al.*, 2017), comprovando a transmissão horizontal do gene entre animais e outras possíveis fontes. Segundo a EMA no ano de 2015 na Alemanha as frequências da presença do gene em aves e alimentos produzidos de animais foram de 2 e 8%, respectivamente, achados semelhantes aos encontrados neste estudo (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2016).

No caso de microrganismos presentes nos alimentos e que podem conter o gene *mcr*, *E. coli* pode ser facilmente transmissível para os seres humanos pelo consumo desses alimentos contaminados, quer sejam de origem animal ou vegetal. Na revisão do Barlaam *et al.* (2019), os pesquisadores dão ênfase na transmissão de genes de resistência à colistina em alimentos como carne crua e leite sem pasteurizar. A maioria das cepas isoladas com resistência adquirida para colistina na cadeia alimentar é de *E. coli*, consistente com os achados neste estudo, embora o estudo de Barlaam *et al.* (2019) relate que em isolados de queijo e leite na Alemanha, não tenha sido detectado o gene *mcr*, provavelmente porque as amostras avaliadas foram coletadas entre os anos de 2010 e 2015, mas é possível que após esse período, a frequência da expressão desse gene tenha aumentado devido a uma maior possibilidade de disseminação pelo uso de polimixinas nos animais. Sabe-se que a transmissão do gene *mcr* teve seu começo dos animais domésticos para os seres humanos através de alimentos, como leite, carne e ovos (GHARAIBEH; SHATNAWI, 2019). Ainda no estudo de Barlaam *et al.* (2019) foi relatado a frequência do gene *mcr* em amostras de carne de frango no Brasil no ano de 2016 e essa foi bastante expressiva (19,5%).

Outro aspecto importante na hora de avaliar cepas positivas para o gene *mcr* é a correlação com outros genes de resistência para antibióticos e seus perfis de sensibilidade. A presença de enterobactérias produtoras de ESBL portadoras do gene *mcr-1* está em ascensão e, portanto, essa ocorrência deve ser relacionada com a resistência antimicrobiana (DALMOLIN *et al.*, 2017; SELLERA *et al.*, 2017). Um achado importante deste estudo é a associação da presença do gene *mcr-1* com os resultados dos laudos para ESBL de pacientes com infecções nosocomiais, como foi reportado num estudo feito por Yauri-Condor *et al.*

(2020), no qual os achados demonstraram que 15,2% das amostras que foram positivas para o gene *mcr-1* eram *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* e *K. oxytoca*, e que essas bactérias mostravam também resistência à ciprofloxacina e à gentamicina (YAURI-CONDOR *et al.*, 2020). Na revisão sistemática feita por Rocha *et al.* (2019), eles relataram que microrganismos positivos para *mcr* exibem altas frequências de resistência para muitos antibióticos, como ampicilina, amoxicilina, ampicilina/sulbactam, além das cefalosporinas e fluoroquinolonas como a ciprofloxacina, semelhante ao que observamos neste estudo onde as bactérias *mcr* positivas apresentaram resistência para amino bencilpenicilinas com inibidores de betalactamases. Dalmolin *et al.* (2017), também demonstraram coocorrência de *mcr-1* e ESBL (*bla*_{KPC-2}) numa amostra clínica de humano no Brasil. Em outro estudo do nosso grupo de pesquisa (Rocha *et al.*, 2019), onde foi analisado o perfil de sensibilidade de espécimes nosocomiais de *K. pneumoniae* ESBL positivos isolados de um hospital de ensino em Sobral, Ceará, pelo sistema automatizado VITEK 2®, também se verificou a ocorrência de uma cepa resistente à colistina (ROCHA *et al.*, 2019).

A detecção do gene *mcr-1* pode ser subestimada em cepas de *E. coli* com sensibilidade para colistina, pois estas podem conter o referido gene e não o estarem expressando (FERNANDES *et al.*, 2016). Dessa forma, para fins epidemiológicos deveria ser feita a detecção do gene *mcr* em amostras independente do perfil do antibiograma, ou seja, mesmo em isolados que se mostrem com sensíveis ou com sensibilidade intermediária para a colistina.

No ano 2020 o CLSI mudou os pontos de corte o *cut-off* de colistina e polimixina B para a interpretação de enterobactérias, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., que agora são classificados em duas categorias, a saber, intermediário (≤ 2 µg/mL) e resistente (≥ 4 µg/mL). Assim sendo, muitas amostras que anteriormente foram classificadas como sensíveis, agora devem ser reclassificadas, uma vez que só poderiam ser inibidas pelas doses máximas recomendadas desses fármacos, podendo-se colocar em risco possíveis fontes de disseminação do gene nos ambientes. Além disso, foi eliminada a categoria de sensível porque ainda não existem valores de CIM associados a uma alta probabilidade de sucesso no tratamento, e essas concentrações maiores apresentam elevada nefrotoxicidade (RED WHONET ARGENTINA, 2019; TSUJI *et al.*, 2019).

No presente estudo, isolados de *K. pneumoniae mcr* positivas de origem humana que apresentaram uma CIM $< 0,25$ µg/mL, anteriormente eram classificadas como sensíveis de acordo com o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e o

CLSI de 2019, uma possível razão para esse achado pode estar relacionado a não expressão gênica, de forma que esses microrganismos não apresentavam o fenótipo típico de resistência para as polimixinas, porém segundo a classificação atual do CLSI (2020), elas são classificadas como cepas com sensibilidade intermediária, devendo-se ter precaução e vigilância com os microrganismos isolados desses pacientes.

Na pesquisa de Pillonetto *et al.* (2018) foram reportadas no estado do Paraná cepas de *E. coli* isoladas de seres humanos e a maioria delas tinha CIM de 2 µg/mL para colistina, apresentando a mesma dinâmica de microrganismos que têm a CIM *borderline* ou no limite para sensibilidade segundo a classificação do CLSI de 2019, mas para a nova classificação já são cepas que têm sensibilidade intermediária.

A identificação nesta pesquisa de cepas de *E. coli* resistentes para colistina que carregam o gene *mcr-1* (CIM de 4 µg/mL) mostra a dinâmica comum deste plasmídeo em microrganismos procedentes de humanos, animais e alimentos que apresentaram CIM maior ou igual a 4 µg/mL, embora essas cepas pudessem apresentar sensibilidade à colistina pelo método automatizado ou pelo BMD na classificação anterior do CLSI (2019). Este estudo corrobora que a identificação de resistência pelos métodos automatizados pode ser complexa, uma vez que atualmente a maioria dos isolados testados por outros métodos como o BMD seria somente aqueles que apresentaram perfil de resistência no Vitek2®. O estudo de Fernandes *et al.* (2016), suporta a mesma ideia, cepas que albergam o *mcr-1* podem exibir baixos níveis de resistência para colistina o que pode garantir a disseminação do gene para humanos, animais e ambientes. Além disso, muitos estudos mostram que a presença do gene *mcr* bloqueia a ação bactericida da colistina independente dos achados na BMD e da CIM que expresse o isolado (MACNAIR *et al.*, 2018). Por isso é muito importante ter em conta os aspectos que mudaram na CLSI no ano de 2020. No caso da América do Sul o Laboratório Nacional de Referência em Resistência aos Antimicrobianos (INEI-ANLIS) recomenda que quando se precise administrar a colistina como única opção de tratamento, que seja obtido o resultado de sensibilidade não somente pelos métodos automatizados, mas que esse resultado seja confirmado pelos métodos de referência como BMD ou *Colistin Drop Test* ou ainda que se obtenha o valor da CIM pela difusão em ágar (RAPOPORT, 2020), junto com a PCR para confirmação da presença do *mcr*, ainda que não esteja sendo expresso o gene, como revelou os dados desse estudo.

Dessa forma, no presente trabalho os achados suportam a identificação do gene *mcr-1* procedente de amostras de diferentes origens e a importância da vigilância

epidemiológica na região Norte do Ceará.

8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

1. A resistência à colistina está estatisticamente associada com a presença do gene *mcr-1* nos isolados de animal e de alimento analisados;
2. A detecção do gene *mcr-1* é um indicador epidemiológico importante e até onde sabemos, este é o primeiro relato da presença de genes de transferência horizontal para resistência à colistina na região Norte do estado do Ceará. Contudo, seria importante conhecer a relação clonal dos genes para ter a relação da origem;
3. A identificação de outros genes nos isolados clínicos de infecções em humanos faz com que essas cepas tenham perfil de multidroga resistência, o que é um indicador muito importante na clinica hospitalar no que diz respeito à terapia e ao prognóstico do paciente;
4. Os isolados de *E. coli* oriundos de animal e alimento apresentaram um perfil de resistência clássico e comum com achados em nível mundial.

REFERÊNCIAS

- AGHAPOUR, Z.; GHOLIZADEH, P.; GANBAROV, K.; BIALVAEI, A. Z.; MAHMOOD, S. S.; TANOMAND, A.; YOUSEFI, M.; ASGHARZADEH, M.; YOUSEFI, B.; KAFIL, H. S. Molecular mechanisms related to colistin resistance in enterobacteriaceae. **Infect Drug Resist**, v. 12, p. 965–975, 2019.
- AIDARA-KANE, A.; ANGULO, F. J.; CONLY, J.; MINATO, Y.; SILBERGELD, E. K.; MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. World Health Organization (WHO) guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2018.
- AL-TAWFIQ, J. A.; LAXMINARAYAN, R.; MENDELSON, M. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? **Int J Infect Dis**, v. 54, p. 77–84, 2017.
- AMANN, S.; NEEF, K.; KOHL, S. Antimicrobial resistance (AMR). **Eur J Hospital Phar**, v. 26 n. 3, p. 175–177, 2019.
- AMERICAN MEDICAL VETERINARY ASSOCIATION. One health: A new professional imperative. **One Health Initiative Task Force Final Report**, p. 76, 2018.
- ANYANWU, M. U.; JAJA, I. F.; NWOBI, O. C. Occurrence and characteristics of mobile colistin resistance (Mcr) gene-containing isolates from the environment: A review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 3, p. 1–38, 2020.
- ARCILLA, M. S.; VAN HATTEM, J. M.; MATAMOROS, S.; MELLES, D. C.; PENDERS, J.; DE JONG, M. D.; SCHULTSZ, C. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. **Lancet Infect Dis**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 147–149, 2016.
- BARLAAM, A.; PARISI, A.; SPINELLI, E.; CARUSO, M.; DI TARANTO, P.; NORMANNO, G. Global emergence of colistin-resistant escherichia coli in food chains and associated food safety implications: A review. **J. Food Prot**, v. 82 n. 8, p. 1440–1448, 2019
- BOSZCZOWSKI, I.; SALOMÃO, M. C.; MOURA, M. L.; FREIRE, M. P.; GUIMARÃES, T.; CURY, A. P.; ROSSI, A. P.; RIZEK, F.; MARTINS, C. F.; RUEDAS, R. C.; COSTA, S. F. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: genetic diversity, mechanisms of resistance to polymyxins and clinical outcomes in a tertiary teaching hospital in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 61, p. e29, 2019.
- CARROLL, L.M.; GABALLA, A.; GULDIMANN, C.; SULLIVAN, G.; HENDERSON, L. O.; WIEDMANN, M. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene mcr-9 in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. **mBio**, v. 10 n. 3, p. 1–6, 2019.
- CAVACO, L.; MORDHORST, H.; HENDRIKSEN, R. Laboratory protocol: PCR for plasmid-mediated colistin resistance genes. **DTU food national food institute**, v. 2, n. October 2016, p. 1–15, 2016.

CLSI. **Polymyxin Breakpoints for Enterobacterales, pseudomonas aeruginosa, and Acinetobacter spp.**, 2020.

COLLIGNON, P.; MCEWEN, S. One Health—Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. **Trop. Med. Infect. Dis**, v. 4 n. 1, p. 22, 2019

DALMOLIN, T. V.; CASTRO, L.; MAYER, F. Q.; ZAVASCKI, A. P.; MARTINS, A. F.; DE LIMA-MORALES, D.; BARTH, A. L. Co-occurrence of mcr-1 and blaKPC-2 in a clinical isolate of Escherichia coli in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 72, n. 8, p. 2404–2406, 2017.

DIAZ-SANCHEZ, S.; MOSCOSO, S.; SOLÍS DE LOS SANTOS, F.; ANDINO, A.; HANNING, I. Antibiotic use in poultry: A driving force for organic poultry production. **Food Protection Trends**, v. 35 n. 6, 440–447, 2015.

DIBNER, J.J., KNIGHT, C., YI, G. F., RICHARDS, J.D. Gut development and health in the absence of antibiotic growth promoters. **Asian-Aust. J. Anim. Sci**, v. 20 n. 6, p. 1007–1014, 2007.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. **Poult Sci**, v, 84 n, 4, p. 634–643, 2005.

DOLEJSKA, M.; PAPAGIANNITSIS, C. C. Plasmid-mediated resistance is going wild. **Plasmid**, v, 99, p. 99–111, 2018.

DOMINGUEZ, J. E.; FIGUEROA ESPINOSA, R. A.; REDONDO, L. M.; CEJAS, D.; GUTKIND, G. O.; CHACANA, P. A.; DI CONZA, J. A.; FERNÁNDEZ-MIYAKAWA, M. E. Plasmid-mediated colistin resistance in Escherichia coli recovered from healthy poultry. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 49, n. 3, p. 297–298, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2017.02.001>>

EMA, E. M. A. Use of glycolcyclines in animals in the European Union : development of resistance and possible impact on human and animal health. European Medicines Agency. **European Medicines Agency**, v. 44, p. 161, 2013.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health**, 2016.

ESTRELA, T. S. Resistência antimicrobiana : enfoque multilateral e resposta brasileira. **Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde**, p. 307–327, 2018.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. **Clin Infect Dis**, v. 24 n. 10, p. 945, 2005.

FERNANDES, M.; MOURA, Q.; SARTORI, L.; SILVA, K.; CUNHA, M.; ESPOSITO, F.; LOPES, R.; OTUTUMI L.K.; GONCALVES, D.D.; DROPA, M.; MATTÉ, M.H.; MONTE,

D.F.; LANDGRAF, M.; FRANCISCO, G.R.; BUENO, M.F.; GARCIA D.O.; KNOBL, T.; MORENO, A.M.; LINCOPAN N. Silent Dissemination of Colistin-Resistant *Escherichia coli* in South America Could Contribute to the Global Spread of the *mcr-1* Gene. **Euro surveill**, v. 21 n. 17, 2016.

GHARAIBEH, M. H.; SHATNAWI, S. Q. An overview of colistin resistance, mobilized colistin resistance genes dissemination, global responses, and the alternatives to colistin: A review. **Veterinary World**, v. 12, n. 11, p. 1735–1746, 2019.

GREKO, C. Safety aspects on non-use of antimicrobials as growth promoters. In: Gut Environment of Pigs. (Ed. A. Piva, K. E. Bach Knudsen and J.E. Lindberg). Nottingham University Press, Nottingham, UK. p. 219-230, 2001.

GURJAR, M. Colistin for lung infection: an update. **J Intensive Care**, v. 134 n. 9, p. 511–515, 2015.

HAMEED, F.; KHAN, M. A.; MUHAMMAD, H.; SARWAR, T.; BILAL, H.; REHMAN, T. U. Plasmid-mediated *mcr-1* gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Pakistan. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 52, p. 1–6, 2019.

HAO, G.; CHEN, A. I.; LIU, M.; ZHOU, H.; EGAN, M.; YANG, X.; KAN, B.; WANG, H.; GOULIAN, M.; ZHU, J. Colistin-resistance-mediated bacterial surface modification sensitizes phage infection. **Antimicrob. Agents Chemother**, (September), 2019.

HARBARTH, S.; BALKHY, H. H.; GOOSSENS, H.; JARLIER, V.; KLUYTMANS, J.; LAXMINARAYAN, R.; SAAM, M.; VAL BELKUM, A.; PITTET, D.; & FOR THE WORLD HEALTHCARE –ASSOCIATED RESISTANCE FORUM PARTICIPANS. Antimicrobial resistance : one world , one fight ! **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, p. 1–15, 2015.

HAYASHI, W.; TANAKA, H.; TANIGUCHI, Y.; IIMURA, M.; SOGA, E.; KUBO, R.; ... NAGANO, N. Acquisition of *mcr-1* and co-carriage of virulence genes in avian pathogenic *Escherichia coli* isolates from municipal wastewater influents in Japan. **App Environl Microbiol**, v. 85, n. 22, p. 17, 2019.

HERNANDO-AMADO, S.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; MARTINEZ, J. L. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. **Nat Microbio**, v. 4 n. 9, p. 1432–1442, 2019.

HMEDE, Z.; SULAIMAN, A. A. A.; JAAFAR, H.; KASSEM, I. I. Emergence of plasmid-borne colistin resistance gene *mcr-1* in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from irrigation water in Lebanon. **Int Journal Antimicrob Agents**, v. 54 n. 1, p. 102–104, 2019.

HOELZER, K.; WONG, N.; THOMAS, J.; TALKINGTON, K.; JUNGMAN, E.; COUKELL, A. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: What, and how strong, is the evidence? **BMC Vet Res** [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–38, 2017.

HUSSEIN, N. H.; AL-KADMY, I. M. S.; TAHA, B. M.; HUSSEIN, J. D. Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 2897–2907, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11033-021-06307-y>>

ICA, I. C. A. RESOLUCIÓN “Por medio de la cual se prohíbe la importación, fabricación, registro, comercialización y uso de aditivos que contengan polimixina E (colistina) y polimixina B como promotores de crecimiento en especies animales productoras de alimentos para e. **Instituto Colombiano Agropecuario ICA**, p. 1–4, 2015.

INS, I. N. DE SALUD. Alerta por la primera detección de *mcr-1* gen de resistencia a colistina en aislamientos de *Salmonella* entérica serovar Typhimurium y *Escherichia coli* de origen humano en Colombia. n. 18, p. 4–8, 2016. Disponível em: <[https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin de laboratorio/Alerta Colombia *mcr1* *Salmonella* y *E. coli*.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Alerta%20Colombia%20mcr1%20Salmonella%20y%20E%20coli.pdf)>. Acesso em: 2 Abr. 2020.

ISHII, Y.; AOKI, K.; ENDO, S.; KIYOTA, H.; AOYAGI, T.; KAKU, M.; BONOMO, R.A.; TATEDA, K. Spread of *mcr-1.5* in the community: an emerging threat. **Int J Antimicrob Agents**, v. 51 n. 1, p. 161–162, 2018.

JIMÉNEZ PEARSON, M. A.; GALAS, M.; CORSO, A.; HORMAZÁBAL, J. C.; DUARTE VALDERRAMA, C.; SALGADO MARCANO, N.; RAMON-PARDO, P.; MELANO, R.G.; RELAVRA. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 43, p. 8, 2019.

JIN, L.; WANG, R.; WANG, X.; WANG, Q.; ZHANG, Y.; YIN, Y.; WANG, H. Emergence of *mcr-1* and carbapenemase genes in hospital sewage water in Beijing, China. **J Antimicrob Chemother**, v. 73 n. 1, p. 84–87, 2018.

KAR, P.; BEHERA, B.; MOHANTY, S.; JENA, J.; MAHAPATRA, A. Detection of Colistin Resistance in Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae by Reference Broth Microdilution and Comparative Evaluation of Three Other Methods. **Journal of Laboratory Physicians**, [s. l.], v. 13, n. 03, p. 263–269, 2021.

KNEIS, D.; BERENDONK, T. U.; HEß, S. High prevalence of colistin resistance genes in German municipal wastewater. **Sci Total Environ**, v. 694, p. 133454, 2019.

LEGARRAGA, P.; WOZNIAK, A.; PRADO, S.; ESTRELLA, L.; GARCÍA, P. First report in Chile of a clinical isolate of *Escherichia coli* resistant to colistin harbouring the *mcr-1* gene. **Rev Chilena Infectol**, v. 35, n. 4, p. 453–454, 2018.

LI, J. Reviving Polymyxins: Achievements, Lessons and the Road Ahead. **Adv Exp Med Biol**, v. 1145, p. 1–8, 2019.

LING, Z.; YIN, W.; SHEN, Z.; WANG, Y.; SHEN, J.; WALSH, T. R. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 75, n. 11, p. 3087–3095, 2020.

LIU, B. T.; LI, X.; ZHANG, Q.; SHAN, H.; ZOU, M.; SONG, F. J. Colistin-Resistant mcr-Positive Enterobacteriaceae in Fresh Vegetables, an Increasing Infectious Threat in China. **Int J Antimicrob Agents**, v. 54 n. 1, p. 89–94, 2019.

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.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIU, J.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. **Lancet Infect Dis**, v. 16 n. 2, p. 161–168, 2016.

LORENZONI, V. V.; DALMOLIN, T. V.; FRANCO, L. N.; BARTH, A. L.; HÖRNER, R. Bloodstream infection by mcr-1-harboring *Escherichia coli* in a cancer patient in southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 22, n. 4, p. 356–357, 2018.

LU, X.; XIAO, X.; LIU, Y.; LI, Y.; LI, R.; WANG, Z. Chromosome-mediated mcr-1 in *Escherichia coli* strain L73 from a goose. **Int J Antimicrob Agents**, v. 54 n. 1, p. 99–101, 2019.

MACNAIR, C. R.; STOKES, J. M.; CARFRAE, L. A.; FIEBIG-COMYN, A. A.; COOMBES, B. K.; MULVEY, M. R.; BROWN, E. D. Overcoming mcr-1 mediated colistin resistance with colistin in combination with other antibiotics. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-02875-z>>

MALBRÁN, C. G.; INEI ANLIS. Emergencia de resistencia plasmidica (transferible) a colistina/polimixina B MCR-1* en Argentina. **Alerta Epidemiológico, Boletín Informativo No. 22 OPS/OMS**, [s. l.] p. 1–9, 2016. Acesso em: 17 Dez. 2019.

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial Resistance: A One Health Colloquium. **Microbiol Spectrum**, v. 6 n. 2, p. 1–26, 2018. Disponível em: <www.chathamhouse.org> Acesso em: 5 Abr. 2020.

MEDINA, J. Actualización acerca de colistina (polimixina E): aspectos clínicos, PK/PD y equivalencias. **Rev Med Urug**, v. 33 n. (3), p. 195–206, 2017.

MINISTERIO PUBLICO FEDERAL. O COMUNICADO DE RISCO nº 01/2016 – GVIMS/GGTES/ANVISA da ANVISA alerta sobre a descoberta de uma nova cepa da bactéria *Escherichia coli* em amostras de pacientes atendidos nos hospitais no Brasil, que apresentaram resistência ao antibiótico colistina. p. 1–27, 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/458700/COMUNICADO+DE+RISCO+N+01+2016+GVIMS+GGTES+ANVISA/2e8b9b28-a383-4fef-bd83-141810e800b3>>. Acesso em: 16 Abr. de 2020.

MONTE, D. F.; MEM, A.; FERNANDES, M. R.; CERDEIRA, L.; ESPOSITO, F.; GALVÃO, J. A.; FRANCO, B.D.; LINCOPAN, N.; LANDGRAF, M. Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying mcr-1 genes in South America. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61 n- 5, p. 1–12, 2017.

MULVEY, M. R.; MATASEJE, L. F.; ROBERTSON, J.; NASH, J. H. E.; BOERLIN, P.; TOYE, B., IRWIN, R., MELANO, R. G. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene.

Lancet Infect Dis, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 292–293, 2016.

NANG, S. C.; LI, J.; VELKOV, T. The rise and spread of mcr plasmid-mediated polymyxin resistance. **Crit Rev Microbiol**, v. 45, n. 2, p. 131–161, 2019.

NESPOROVA, K.; JAMBOROVA, I.; VALCEK, A.; MEDVECKY, M.; LITERAK, I.; DOLEJSKA, M. Various conjugative plasmids carrying the mcr-5 gene in Escherichia coli isolates from healthy chickens in Paraguay. **J Antimicrob Chemother**, v. 74, p. 3394–3397, 2019.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Front Microbiol**, v. 5, p. 1–19, 2014

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, & ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, implicaciones para la salud pública en las Américas. p. 1–5, 2016. Disponible em: <<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-jun-10-alerta-epi-enterob-resist.pdf>>. Acceso em: 15 Out. 2019.

OSEI SEKYERE, J. Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. **MicrobiologyOpen**, v. 8 n. 4, p. 1–21, 2019.

PAPA-EZDRA, R.; DIAZ, F. G.; VIEYTES, M.; GARCÍA-FULGUEIRAS, V.; CAIATA, L.; ÁVILA, P.; BRASESCO, M.; CHRISTOPHERSEN, I.; CORDEIRO, N.F.; ALGORTA, G.; GALIANA, A.; VIGNOLI, R. First three Escherichia coli isolates harboring mcr-1 in Uruguay. **J Glob Antimicrob Resist**, 2019.

PATHARKAR, R. Plasmid DNA isolation. Alkaline Lysis Miniprep, 2018. Video (11 min). Disponible em: <https://www.youtube.com/watch?v=pw5jgvKn6dw>. Acceso em: 01 Out. 2020.

PILLONETTO, M.; MAZZETTI, A.; BECKER, G. N.; SIEBRA, C. A.; AREND, L. N. V. S.; BARTH, A. L. Low level of polymyxin resistance among non-clonal mcr-1-positive Escherichia coli from human sources in Brazil. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, p. 10, 2018. Disponible em: <<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.009>>

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. **Pathog Glob Health**, v. 109 n. 7, p. 309–318, 2015.

RAMON-PARDO, P.; SATI, H.; GALAS, M. “One health” approach in the actions to address antimicrobial resistance from a Latin American standpoint. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 35 n. 1, p. 103–109, 2018.

RAPOPORT, M. NOVEDADES 2020 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Laboratorio Nacional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos – INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” NOVEDADES**, [s. l.], p. 1–18, 2020.

RAPOPORT, M.; FACCONI, D.; PASTERAN, F.; CERIANA, P.; ALBORNOZ, E.; PETRONI, A.; CORSO, A. First Description of mcr-1 Mediated Colistin Resistance in Human Infections Caused by *Escherichia coli* in Latin America. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 7, p. 4412 LP – 4413, 2016.

REBELO, A. R.; BORTOLAIA, V.; KJELDGAARD, J. S.; PEDERSEN, S. K.; LEEKITCHAROENPHON, P.; HANSEN, I. M.; GUERRA, B.; MALORNY, B.; BOROWIAK, M.; HAMMERL, J. A.; BATTISTI, A.; FRANCO, A.; ALBA, P.; PERRIN-GUYOMARD, A.; GRANIER, S. A.; DE FRUTOS ESCOBAR, C.; MALHOTRA-KUMAR, S.; VILLA, L.; CARATOLLI, A.; HENDRIKSEN, R. S. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. **Euro Surveill**, v. 23, n. 6, p. 1–11, 2018.

RED WHONET ARGENTINA. Protocolo De Trabajo Red WHONET Argentina. **XIX Taller WHONET-Argentina**, p. 1–56, 2019. Disponível em: <<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/Protocolo-WHONET-consensuado-2017-final.pdf>>. Acesso em: 28 Jul. 2020.

REEVE-JOHNSON, L. One Health and antimicrobial resistance. **Veterinary Record**, v. 180 n. 5, p. 125–126, 2017.

RHOUMA, M.; BEAUDRY, F.; THÉRIAULT, W.; LETELLIER, A. Colistin in pig production: Chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. **Front Microbiol**, v. 7, p. 1–22, 2016.

ROBINSON, T. P.; BU, D. P.; CARRIQUE-MAS, J.; FÈVRE, E. M.; GILBERT, M.; GRACE, D.; HAY, S.I.; JIWAKANON, J.; KAKKAR, M.; KARIUKI, S.; LAXMINARAYAN, R.; LUBROTH, J.; MAGNUSSON, U., NGOC, P.T.; VAN BOECKEL T.P.; WOOLHOUSE, M. E. J. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. **Trans R Soc Trop Med and Hyg**, v. 110 n. 7, p. 377–380, 2016.

ROCHA, C.; REYNOLDS, N. D.; SIMONS, M. P. Emerging antibiotic resistance: A global threat and critical healthcare problem. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 32, n. 1, p. 139–145, 2015.

ROCHA, F. R.; FEHLBERG, L. C. C.; CORDEIRO-MOURA, J. R.; RAMOS, A. C.; PINTO, V. D. P. T.; BARBOSA, F. C. B. High Frequency of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Strains Isolated from a Teaching Hospital in Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 25 n. 6, p. 909–914, 2019.

ROCHA, V.; PAIVA, M. C.; LIMA, W. G. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean : A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 31, n. February, p. 101459, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.07.015>>

RODRIGUES, A. C. S.; SANTOS, I. C. D. O.; CAMPOS, C. C.; REZENDE, I. N.; FERREIRA, Y. M.; CHAVES, C. E. V.; ROCHA DE SOUZA, C.M.; D'ALINCOURT, A.P.; CHANG, M. R. Non-clonal occurrence of pmrb mutations associated with polymyxin resistance in carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo**

Cruz, v. 114 n. 4, p. 1–6, 2019.

ROSALES, R.; ROJAS, L.; ZAMORA, F.; IZQUIERDO, G.; BENAVIDES, C.; GONZÁLEZ, C. El desafío en la dosificación de colistin: actualización de las recomendaciones disponibles. **Rev Chilena Infectol**, v. 35, n. 2, p. 105–116, 2018.

RUZAUSKAS, M.; VASKEVICIUTE, L. Detection of the mcr-1 gene in Escherichia coli prevalent in the migratory bird species Larus argentatus. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, n. 8, p. 2333–2334, 2016.

SAIDENBERG, A. B. S.; STEGGER, M.; PRICE, L. B.; JOHANNESSEN, T. B.; AZIZ, M.; CUNHA, M. P. V.; MORENO, A. M.; KNÖBL, T. mcr-Positive Escherichia coli ST131-H22 from Poultry in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 8, p. 459–461, 2020.

SELLERA, F. P.; FERNANDES, M. R.; SARTORI, L.; CARVALHO, M. P. N.; ESPOSITO, F.; NASCIMENTO, C. L.; DUTRA, G. H. P.; MAMIZUKA, E. M.; PÉREZ-CHAPARRO, P. J.; MCCULLOCH, J. A.; LINCOPAN, N. Escherichia coli carrying IncX4 plasmid-mediated mcr-1 and blaCTX-M genes in infected migratory Magellanic penguins (Spheniscus magellanicus). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. 1255–1256, 2017

SENASA. Colistina y sus sales - Productos veterinarios: prohibición de elaboración, distribución, importación, uso y tenencia. **Cámara Argentina de Comercio y Servicios**, p. 13–15, 2019.

SHAD, A. A. MCR-1 Colistin Resistance in Escherichia coli Wildlife: A Continental Mini-review. **J Drug Metabm Toxicol**, v. 09, n. 03, p. 9–11, 2018.

SKOV, R. L.; MONNET, D. L. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. **Euro surveill**, v. 21, n. 9, p. 1–6, 2016.

SKOV, R.; SKOV, G. EUCAST. European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing: Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica. European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing: Orientações Do EUCAST Para a Detecção de Mecanismos de Resistência e Resistências Específicas de Importância Clínica e/Ou Epidemiológica, p. 3 - 46, 2017. Disponível em: < <http://brcast.org.br/documentos/>>. Acesso em: 2 Abr. 2020.

SOLOMON, E.; MATTHEWS, K. R.; SOLOMON, E. B.; YARON, S.; MATTHEWS, K. R. Transmission of Escherichia coli O157 : H7 from Contaminated Manure and Irrigation Water to Lettuce Plant Tissue and Its Subsequent Internalization. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, p. 397–400, 2014

SOLOMON, S.L. The unique Contribution of One Health To Combating Antibiotic Resistance, **AMR control**, 2017. Disponível em: <http://resistancecontrol.info/2017/the-unique-contribution-of-one-health-to-combating-antibiotic-resistance-2/> Acesso em: 20 Dez. 2019.

SNESRUD, E.; HE, S.; CHANDLER, M.; DEKKER, J. P.; HICKMAN, A. B.; MCGANN, P.; DYDA, F. A model for transposition of the colistin resistance gene *mcr-1* by ISAp11. **Antimicrob Agents Chemother**, [s. l.], v. 60, n. 11, p. 6973–6976, 2016.

THAKUR, S.; GRAY, G. C. The mandate for a global “one health” approach to antimicrobial resistance surveillance. **Am J Trop Med Hyg**, v. 100, n. 2, p. 227–228, 2019.

TOUATI, M.; HADJADJ, L.; BERRAZEG, M.; BARON, S.; ROLAIN, J. M. Emergence of *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *mcr-3* gene in North West Algerian farmlands. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 21, p. 132-137, 2019.

TSUJI, B. T.; POGUE, J. M.; ZAVASCKI, A. P.; PAUL, M.; DAIKOS, G. L.; FORREST, A.; GIACOBBE, D. R.; VISCOLI, C.; GIAMARELLOU, H.; KARAIKOS, I.; KAYE, D.; MOUTON, J. W.; TAM, V. H.; THAMLIKITKUL, V.; WUNDERINK, R. G.; LI, J.; NATION, R. L.; KAYE, K. S. International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). **Pharmacotherapy**, v. 39, n. 1, p. 10–39, 2019.

TYRRELL, J. M.; ABOKLAISH, A. F.; WALSH, T. R.; VAARA, T.; VAARA, M. The polymyxin derivative NAB739 is synergistic with several antibiotics against polymyxin-resistant strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*. **Peptides**, v. 112, p. 149–153, 2019.

UDDIN, M. B.; ALAM, M. N.; HASAN, M.; HOSSAIN, S. M. B.; DEBNATH, M.; BEGUM, R.; SAMAD, M. A.; HOQUE, S. F.; CHOWDHURY, M. S. R.; RAHMAN, M. M.; HOSSAIN, M. M.; HASSAN, M. M.; LUNDKVIST, Å.; JÄRHULT, J. D.; EL ZOWALATY, M. E.; AHMED, S. S. U. Molecular Detection of Colistin Resistance *mcr-1* Gene in Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Chicken. **Antibiotics**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 97, 2022.

UGARTE SILVA, R. G.; OLIVO LÓPEZ, J. M.; CORSO, A.; PASTERAN, F.; ALBORNOZ, E.; SAHUANAY BLÁCIDO, Z. P. Resistencia a colistín mediado por el gen *mcr-1* identificado en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Primeros reportes en el Perú. **An Fac Med**, v. 79 n- 3, p. 213, 2018.

VAN BOECKEL; T. P., PIRES, J.; SILVESTER, R.; SONG, J.; GILBERT, M.; BONHOEFFER, S.; R. LAXMINARAYAN. Global Trends in Antimicrobial Resistance in Animals in Low- and Middle-income Countries. **Science**, v. *Forthcomin* (September), p. 5, 2019.

VENDRUSCOLO, T. Resistência às polimixinas: caracterização molecular (foco no gene *mcr-1*) e avaliação de métodos de detecção. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. v. 53, n. 9, p.117, 2019.

VIDAVER, A. K. Uses of Antimicrobials in Plant Agriculture. **Clin Infect Dis**, [s. l.], v. 34, n.

s3, p. S107–S110, 2002.

WALSH, T. R. A one-health approach to antimicrobial resistance. **Nat Microbiol**, v. 3, n. 8, p. 854–855, 2018.

WANG, C.; FENG, Y.; LIU, L.; WEI, L.; KANG, M.; ZONG, Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. **Emerg Microbes Infect**, v. 9, n. 1, p. 508–516, 2020.

WANG, G.; LIU, H.; FENG, Y.; ZHANG, Z.; HU, H.; LIU, J.; QIU, L.; GUO, Z.; HUANG, J.; QIU, J.; DU, C. Colistin-resistance mcr genes in *Klebsiella pneumoniae* from companion animals. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [s. l.], v. 25, p. 35–36, 2021.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.02.023>>

WANG, Y.; LIU, F.; ZHU, B.; GAO, G. F. Metagenomic data screening reveals the distribution of mobilized resistance genes tet(X), mcr and carbapenemase in animals and humans. **J Infect**, [s. l.], n. X, 2019.

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. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. **Nat Commun**, v. 9 n. 1, p. 1–9, 2018.

WENJUAN YIN, HUI LI, Y. S.; LIU, Z.; WANG, S.; SHEN, Z.; ZHANG, R.; TIMOTHY R. WALSH; SHEN, J. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-3 in *Escherichia coli*. **mBio**, p. 4–9, 2017.

WHITE, A.; HUGHES, J. M. Critical Importance of a One Health Approach to Antimicrobial Resistance. **Eco Health**, v. 16, p. 404 - 409, 2019.

WHO. WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. **World Health**, p. 1–27, 2000.

WHO. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report. In **Who**, 2017.

WHO. The detection and reporting of colistin resistance. **World Health Organisation**, [s. l.], v. WHO/WSI/AM, p. 1–17, 2018.

WHO; AGISAR. Critically important antimicrobials for human medicine. 5th revision. In **World Health Organization**. ISBN 9789241504485, 2017. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf. Acesso em: 7 Maio. 2020.

WISE, M. G.; ESTABROOK, M. A.; SAHM, D. F.; STONE, G. G.; KAZMIERCZAK, K. M. Prevalence of mcr-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014–2016 as part of the INFORM global surveillance program. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–8, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. v. 26, n. 3, p. 234, 2014. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf. Acesso em: 17 Dez. 2019.

XAVIER, B.B.; LAMMENS, C.; RUHAL, R.; KUMAR-SINGH, S.; BUTAYE, P.; GOOSSENS, H.; MALHOTRA-KUMAR, S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. **Euro Surveill.** v. 21, n. 27, p. 2016.

XIA, X.; WANG, Z.; FU, Y.; DU, X. DANG; GAO, B.; ZHOU, Y.; HE, J.; WANG, Y.; SHEN, J.; JIANG, H.; WU, Y. Association of colistin residues and manure treatment with the abundance of *mcr-1* gene in swine feedlots. **Environ Int**, v. 127, p. 361–370, 2019.

XU, Y.; ZHONG, L. L.; SRINIVAS, S.; SUN, J.; HUANG, M.; PATERSON, D. L.; LEI, S.; LIN, J.; LI, X.; TANG, Z.; FENG, S.; SHEN, C.; TIAN, G. B.; FENG, Y. Spread of MCR-3 Colistin Resistance in China: An Epidemiological, Genomic and Mechanistic Study. **EBioMedicine**, v. 34, p. 139–157. 2018.

YANG, Y. H.; BUTTERY, J. Antimicrobial resistance: a global one-health problem for all ages. **World J Pediatr**, [s. l.], n. 0123456789, p. 2–3, 2018

YAURI-CONDOR, K.; ZAVALETA APESTEGUI, M.; SEVILLA-ANDRADE, C. R.; PISCOYA SARA, J.; VILLOSLADO ESPINOZA, C.; VICENTE TABOADA, W.; GONZALES-ESCALANTE, E. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacterales carrying the *mcr-1* gene in Lima, Peru. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 711–715, 2020.

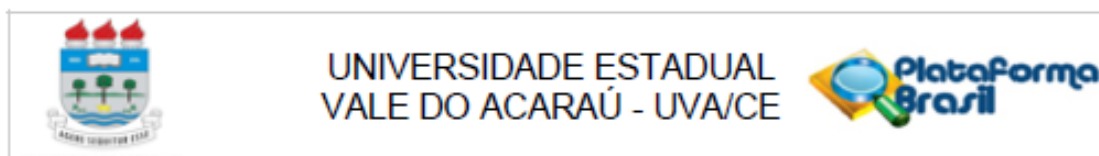
ZHANG, S.; ABBAS, M.; REHMAN, M. U.; WANG, M.; JIA, R.; CHEN, S.; LIU, M.; ZHU, D.; ZHAO, X.; GAO, Q.; TIAN, B.; CHENG, A. Updates on the global dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli*: An emerging threat to public health. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 799, p. 149280, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149280>>

ZHANG, P.; WANG, J.; WANG, X.; BAI, X.; MA, J.; DANG, R.; XIONG, Y.; FANNING, S.; BAI, LI.; YANG, Z. Characterization of five *Escherichia coli* isolates co-expressing ESBL and *mcr-1* resistance mechanisms from different origins in China. **Front Microbiol**, v. 10, p. 1–9, 2019.

ZHI, C.; LV, L.; YU, L. F.; DOI, Y.; LIU, J. H. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. **Lancet Infect Dis**, v. 16 n. 3, p. 292–293, 2016.

ZHIFENG, L.; TONY, V. Polymixins: Mode of Action. Chapter 4. Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside. *Experimental Medicine and Biology*. **Adv Exp med Biol**, v. 1145, p. 37 - 54, 2019.

ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE *mcr* E SUAS VARIANTES EM ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE SERES HUMANOS, ANIMAIS E DA ÁGUA EM SOBRAL, CE: UMA ABORDAGEM DE SAÚDE ÚNICA.

Pesquisador: ERIKA ALEXANDRA DAZA CARDONA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 32838720.5.0000.5053

Instituição Proponente: Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.206.357

Apresentação do Projeto:

A resistência antimicrobiana é reconhecida como um dos problemas globais mais importantes de saúde humana no século XXI. O equilíbrio entre a necessidade clínica e a prevenção de resistência é ainda mais comprometido pelo uso agrícola de antibióticos, uma vez que alguns países têm usado ativamente a Colistina na produção animal. Microrganismos resistentes a antimicrobianos são encontrados em humanos, alimentos, animais, plantas e meio ambiente (água, solo e ar) e eles podem se disseminar entre ecossistemas. Recentemente, foi relatada a presença de microrganismos isolados de amostras biológicas que expressam resistência plasmidial à Colistina mediada pelo gene *mcr-1* ou suas variantes. O objetivo deste estudo é detectar e caracterizar a presença do gene *mcr* responsável pela resistência à Colistina em enterobactérias isoladas de seres humanos, animais e amostras ambientais. A identificação e o perfil de sensibilidade das bactérias serão realizados pelo sistema automatizado VITEK® 2. Um total de 60 amostras será analisado, sendo 20 de cada origem; humana, animal e água, respectivamente. A identificação molecular do gene *mcr* será feita pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e visualizado por eletroforese em gel de agarose. Para isolados positivos será realizada avaliação do perfil de sensibilidade às polimixinas pelo método de Microdiluição em caldo. Com os resultados pretende-se detectar o gene de resistência *mcr* em espécimes de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* e qual o perfil de sensibilidade desses

Endereço: Av Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 150
Bairro: Derby **CEP:** 62.041-040
UF: CE **Município:** SOBRAL
Telefone: (88)3677-4255 **Fax:** (88)3677-4242 **E-mail:** uva_comitedeetica@hotmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ - UVA/CE



Continuação do Parecer: 4.206.357

isolados aos diferentes antibióticos que são amplamente usados na prática médica atual para o tratamento de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Dessa forma, pode-se verificar se os isolados que apresentem o gene *mcr* estão expressando resistência às polimixinas e a outros antimicrobianos. Portanto, este estudo poderá contribuir com informações de caráter molecular e epidemiológico, dando um enfoque de Saúde Única, uma preocupação atual da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE).

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

Dada a ocorrência de bacilos entéricos isolados de pacientes com infecção nosocomial com resistência à colistina, a nossa hipótese inicial é que haja a detecção de genes *mcr* em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* de origem animal, ambiental e de seres humanos.

Objetivo Primário:

Detectar e caracterizar a presença do gene *mcr* responsável pela resistência à colistina em enterobactérias isoladas de seres humanos, animais e amostras ambientais de água numa abordagem de "Saúde Única".

Objetivo Secundário:

- a. Confirmar identificação bioquímica e analisar o perfil de sensibilidade de enterobactérias isoladas de amostras humanas, de animais e ambientais através do método automatizado VITEK 2®;
- b. Avaliar o perfil de sensibilidade às Polimixinas de enterobactérias isoladas de amostras humanas, de animais e ambientais pelo método de Microdiluição em Caldo (BMD);
- c. Verificar a ocorrência dos genes *mcr-1* e *mcr-2* em enterobactérias isoladas de amostras humanas, de animais e ambientais pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

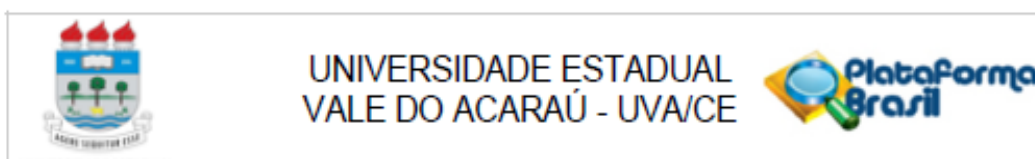
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram devidamente esclarecidos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver conclusão.

Endereço: Av Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 150
 Bairro: Derby CEP: 62.041-040
 UF: CE Município: SOBRAL
 Telefone: (88)3677-4255 Fax: (88)3677-4242 E-mail: uva_comitedeetica@hotmail.com



Continuação do Parecer: 4.206.357

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória atendem as normas estabelecidas pelo Sistema CEP/CONEP.

Recomendações:

Recomendo a atualização do cronograma. Apresentar relatório final da pesquisa a este CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado. Os pesquisadores cumpriram com as pendências pontuadas pela relatoria. No item 7 do projeto detalhado especificaram que as amostras de origem humana, animal e ambiental fazem parte de coleções biológicas (Biobancos) provenientes dos Laboratórios de Microbiologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) e da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA). Finalizo pontuando que todas as recomendações foram acatadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP/UVA, após apresentação e discussão do parecer pelo relator, acatou a relatoria que classifica como aprovado o protocolo de pesquisa. O(a) pesquisador(a) deverá atentar para as recomendações listadas neste parecer.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1565703.pdf	09/07/2020 14:01:29		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Concordancia.pdf	09/07/2020 13:59:35	FRANCISCO CESAR BARROSO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	MATERIALBiologico.pdf	09/07/2020 13:55:54	FRANCISCO CESAR BARROSO BARBOSA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	09/07/2020 13:53:34	FRANCISCO CESAR BARROSO BARBOSA	Aceito
Outros	Solicitacao_de_Dispensa_de_TCLE.pdf	29/05/2020 18:02:24	FRANCISCO CESAR BARROSO	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	29/05/2020 17:47:57	FRANCISCO CESAR BARROSO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	29/05/2020 17:19:13	FRANCISCO CESAR BARROSO	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	29/05/2020	FRANCISCO CESAR	Aceito

Endereço: Av Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 150
 Bairro: Derby CEP: 62.041-040
 UF: CE Município: SOBRAL
 Telefone: (88)3677-4255 Fax: (88)3677-4242 E-mail: uva_comitedeetica@hotmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ - UVA/CE



Continuação do Parecer: 4.206.357

Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	17:10:00	BARROSO	Aceito
----------------	------------------	----------	---------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SOBRAL, 11 de Agosto de 2020

Assinado por:

Maria do Socorro Melo Carneiro
(Coordenador(a))

Endereço: Av Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 150
 Bairro: Derby CEP: 62.041-040
 UF: CE Município: SOBRAL
 Telefone: (88)3677-4255 Fax: (88)3677-4242 E-mail: uva_comitedeetica@hotmail.com