



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA- UnICEUB**  
**PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**ANTONIO CABRAL DE OLIVEIRA JUNIOR**  
**JULIANA LUCAS MERIDA**

**RESISTÊNCIA À COLISTINA EM ISOLADOS DE ENTEROBACTÉRIAS DE**  
**AMOSTRAS FECAIS DE SUÍNOS NO DISTRITO FEDERAL**

**BRASÍLIA**

**2020**



**ANTONIO CABRAL DE OLIVEIRA JUNIOR**

**JULIANA LUCAS MERIDA**

**RESISTÊNCIA À COLISTINA EM ISOLADOS DE ENTEROBACTÉRIAS DE  
AMOSTRAS FECAIS DE SUÍNOS NO DISTRITO FEDERAL**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Me. Fabíola Fernandes dos Santos Castro

**BRASÍLIA**

**2020**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaríamos de agradecer a nossa orientadora, Me. Fabíola Castro, por toda a dedicação e companheirismo durante a nossa jornada do projeto de pesquisa. Esse ano de 2020 foi um ano de muitas incertezas e dificuldades, agradecemos todo auxílio a nós prestado por ela.

Depois, gostaríamos de agradecer à Instituição de ensino UniCeub pela oportunidade de podermos adquirir conhecimento de uma forma tão genuína que é um projeto de iniciação científica.

E também gostaríamos de agradecer a todas as pessoas envolvidas indiretamente com esse projeto. Nossas famílias que nos incentivou na realização da pesquisa. E aos funcionários do UniCeub que foram receptivos e solícitos.

## RESUMO

Utilizados na prática clínica para a realização de tratamento de infecções por bacilos Gram negativos multirresistentes, as polimixinas são consideradas a última opção terapêutica. Estes antimicrobianos polipeptídicos atuam nas membranas celulares bacterianas, ocasionando a diminuição da integridade da parede celular, e conseqüente morte celular. Para criar resistência às polimixinas alguns microrganismos são capazes de alterar o lipopolissacarídeo presente em sua parede celular, reduzindo significativamente a afinidade do antimicrobiano pela superfície celular, e estas modificações são reguladas por diferentes genes, os quais são ativados por fatores ambientais como presença de cátions, pH ou presença do antimicrobiano. A ativação desses fatores desencadeia a ação de uma cascata de genes que, em conseqüência, confere o fenótipo de resistência às polimixinas. O surgimento de microrganismos resistentes é um problema mundial, pois tornaram o tratamento mais difícil de tratar graças a baixa opção terapêutica. A viabilidade e a manutenção do uso das polimixinas é essencial para tratamento de infecções desenvolvidas por bactérias multirresistentes, até que apareçam novas opções terapêuticas ainda não disponíveis. O principal mecanismo de resistência às polimixinas ocorre por meio da modificação do lipídio A, resultando na redução da afinidade à polimixina. Até o momento, todos mecanismos de resistência à polimixina relatados eram cromossômicos e envolviam a modulação de sistemas reguladores de dois componentes, por exemplo, pmrAB, phoPQ, e seu regulador negativo mgrB no caso de *K. pneumoniae*, levando à modificação do lipídio A com frações como fosfoetanolamina ou 4-amino-4-arabinose, ou em raros casos perda total do lipopolissacarídeo. Os relatos são predominantemente quanto à resistência à colistina via mutações cromossômicas e, apesar de relatos sobre surtos clonais, a resistência é muitas vezes instável, com um custo de aptidão à bactéria, demonstrando ser incapaz de se espalhar para outras bactérias. O surgimento de resistência à colistina mediada por plasmídeos na forma do MCR-1, relatada na pesquisa divulgada por LIU et al. (2016), torna-se um achado de significância global. A intenção deste trabalho foi analisar a presença da resistência antimicrobiana à colistina (polimixina) em suínos de fazendas no Distrito Federal, avaliando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e pesquisar a presença do gene MCR-1 (do inglês, Mobile Colistin Resistance).

**Palavras-Chave: Resistência bacteriana. Colistina. Gene MCR-1.**

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	6
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
MÉTODO	11
RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
REFERÊNCIAS	21

## INTRODUÇÃO

Claramente, o surgimento de doenças emergentes é uma constelação intrigante de novas entidades e de patógenos reconhecidos que causam surtos recentes de tamanho sem precedentes. O surgimento de microrganismos resistentes tem sido um fenômeno global, e se tornaram mais difíceis de tratar devido ao aumento das resistências aos medicamentos (TENOVER; HUGHES, 1996).

Institutos renomados de medicina advertem da complacência que se tem desenvolvido em relação às doenças infecciosas e salientam a necessidade de maior vigilância para garantir detecção e respostas rápidas ao emergir de doenças infecciosas resistentes. A resistência bacteriana tem sido um alvo constante dos Centros de Controle de Doenças e suas estratégias buscam lidar com estas infecções emergentes. A resistência a agentes antimicrobianos não é um fenômeno novo, o primeiro mecanismo de resistência foi registrado em 1940 por Abraham e Chain, que isolaram e caracterizaram uma enzima de *Escherichia coli*, a qual era capaz de hidrolisar a molécula de penicilina (ABRAHAM; CHAIN, 1940).

Em 1944, Kirby relatou uma penicillinase do tipo similar com enzimas produzidas por *Staphylococcus aureus*. Portanto, mesmo antes do uso generalizado de penicilina em todo o mundo, a resistência tinha sido detectada, tanto em organismo Gram positivos, quanto em Gram negativos (KIRBY, 1944).

Em 1959, a resistência a múltiplas drogas foi reconhecida em cepas de *Shigella dysenteriae* no Japão, e descoberto que todos os traços de resistência nesse organismo poderiam ser transferidos para uma cepa receptora de *Escherichia coli* via célula a célula, por meio da conjugação. Nos anos de 1960 e 1970 a multirresistência emergiu novamente, primeiro em *Staphylococcus aureus*, e em seguida em uma variedade de bacilos Gram negativos, particularmente aqueles causadores de surtos nosocomiais (TENOVER, 1991).

Preocupações em relação ao aumento da resistência na comunidade de agentes patogênicos foram alardeadas a partir do reconhecimento de cepas de *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* que tinham adquirido a informação genética para produzir a  $\beta$ -lactamase. Estes eventos exigiram que os médicos alterassem a terapia empírica para estas infecções, tornando assim a ameaça de resistência mais tangível. Enquanto a resistência está aumentando em muitos patógenos, o número de novos agentes antimicrobianos aprovados para uso têm diminuído. Assim, a resistência é um grande problema em medicina

humana e os efeitos observados estão em uma escala cada vez maior. Outro fator importante é que a taxa na qual a resistência que microrganismos desenvolvem não é apenas uma função do uso de antimicrobianos em humanos, mas também é altamente influenciada pelo uso desses agentes em medicina veterinária, pecuária, agricultura e aquicultura, como tem sido demonstrado por diversos estudos. O uso indiscriminado de antibióticos, na área médica, é um fato citado em diversos trabalhos nacionais e internacionais. Neste contexto, a resistência de microrganismos aos antimicrobianos tem aumentado de maneira espetacular nas últimas décadas, com efeitos devastadores sobre a luta contra doenças, tais como, tuberculose (que recrudescceu com o advento da AIDS), cólera, disenteria bacilar, pneumonia e infecções hospitalares. O mesmo se aplica a *Salmonella* sp., um dos principais agentes bacterianos causadores de infecções transmitidas por alimentos, e as bactérias enterocócicas que provocam uma multiplicidade de complicações em pacientes hospitalizados (ENGELKIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 1992; QUEIROZ, 2002).

Até o momento, as polimixinas continuam sendo uma das últimas classes de antibióticos em que a resistência não é conferida via plasmídeo. O principal mecanismo de resistência às polimixinas ocorre por meio da modificação do lipídio A, resultando na redução da afinidade à polimixina. Até agora, todos os mecanismos de resistência à polimixina relatados são cromossômicos e envolve a modulação de sistemas reguladores de dois componentes, por exemplo, *pmrAB*, *phoPQ*, e seu regulador negativo *mgrB* no caso de *K. pneumoniae*, levando à modificação do lipídio A com frações como fosfoetanolamina ou 4-amino-4-arabinose, ou em raros casos perda total do lipopolissacarídeo (CANNATELLI et al., 2013; KEMPF et al., 2013).

O trabalho tem como objetivo investigar a presença da resistência antimicrobiana à colistina (polimixina) em suínos de fazendas no Distrito Federal. Bem como avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e pesquisar a presença do gene MCR-1 (do inglês, Mobile Colistin Resistance).

## **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

A resistência bacteriana é um fenômeno natural devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos no ambiente global. As bactérias são os seres mais antigos da Terra e sua persistência no meio ambiente justifica-se, entre outras, devido à habilidade em promover

mecanismos de resistência a outros microrganismos. No entanto, quando pensamos na resistência bacteriana inserida no contexto da terapêutica medicamentosa, o assunto toma outra dimensão. O primeiro relatório global sobre a resistência bacteriana, publicado pela WHO, com título *Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*, data de maio de 2014 e, segundo conclusão da entidade, a resistência a antibióticos é uma "ameaça global" à saúde pública. Com esse alerta, os países membros são encorajados a desenvolver seus próprios planos de ação nacionais para prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos dentro dos próximos dois anos, em consonância com o Plano de Ação Global (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Estas preocupações sérias foram catalisada pelo rápido aumento da produção de carbapenemas *Enterobacteriaceae* expressando enzimas como KPC-2 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2) e NDM-1 (Nova Delhi metalo-βlactamase-1). Nas infecções causadas por Enterobactérias produtoras de carbapenemase, as opções de tratamento são restritas e invariavelmente dependem da tigeciclina e colistina, seja singularmente ou em combinação com outros antibiótico, de forma que o aumento de infecções por Enterobactérias produtoras de carbapenemases resultou no aumento do uso de colistina com o inevitável risco de resistência emergente (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS; NORDMANN, 2011).

A colistina pertence à família das polimixinas, catiônicas polipeptídeos, com atividade de amplo espectro contra bactérias Gram negativas, incluindo a maioria das espécies da família *Enterobacteriaceae*. As duas polimixinas atualmente em uso clínico são a polimixina B e a polimixina E (colistina), que diferem apenas por um aminoácido, porém têm atividade biológica comparável. Até o momento, as polimixinas continuam sendo uma das últimas classes de antibióticos em que a resistência não é conhecida por se disseminar via plasmídeo (CANNATELLI et al., 2013; KEMPF et al., 2013). Até agora, a resistência à colistina ocorreu via mutações cromossômicas e, apesar de surtos clonais relatados, a resistência é muitas vezes instável, com um custo de aptidão à bactéria e é incapaz de se espalhar a outras bactérias (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS; NORDMANN, 2011). Entretanto, a rápida disseminação dos mecanismos de resistência citados anteriormente indica que, com o advento da resistência à colistina transmissível, em progressão da Enterobactéria resistência a drogas, a resistência inevitável acabará por se tornar global. Neste contexto, o surgimento de resistência à colistina mediada por plasmídeos em forma do MCR-1 é um achado de significância global (KUMARASAMY et al., 2010).



Segundo Liu et al. (2016, p.165):

É desconcertante que o plasmídeo contendo *mcr-1*, pHNSHP45, tenha uma taxa de transferência *in vitro* muito alta, entre Cepas de *E. coli*. Além disso, pHNSHP45 é capaz de transferir para cepas epidêmicas de *Enterobacteriaceae*, como *E. coli* ST131 e *K. pneumoniae* ST11, assim como em *P. aeruginosa*, sugerindo que o *mcr-1* é susceptível a se espalhar rapidamente em patógenos humanos importantes. Dados preliminares de estabilidade do plasmídeo sugerem que pHNSHP45 é estável em ambos os transconjugantes e sua estirpe hospedeira principal, mesmo sem a pressão seletiva do polimixinas. Extrapolando esses dados para o ambiente mais amplo sugeriria que os plasmídeos *mcr-1* serão mantidos em populações de *Enterobacteriaceae* independentemente da pressão de seleção, e que isso facilitará sua disseminação em populações humanas.

No sul da China, a alta prevalência de MCR-1, em isolados de *E. coli* de animais e varejo de origem de carne foi surpreendente, com indicação que MCR-1 já possa estar difundido em animais de produção, transmitido horizontalmente de animais para animais. No entanto, os dados preliminares apresentados para a carne crua podem ser pouco representativos, tendo em conta o baixo número amostral. Esses dados contrastam com a proporção relativamente baixa de isolados MCR-1 positivos de origem humana, sendo provável que o MCR-1 cuja resistência à colistina mediada teve origem animal e posteriormente foi disseminada para os seres humanos. Embora raramente utilizado no tratamento humano, a colistina continua a ser uma opção para infecções por Enterobactérias produtoras de carbapenemase, e quando é usado traz bons resultados. Os níveis de concentrações inibitórias máximas de polimixina conferidos pelo MCR-1 não sejam muito altos (variando de 4 a 8 µg/mL), em modelos de infecção *in vivo*, a aquisição de MCR-1 por cepas de *Enterobacteriaceae* produtora de carbapenemase têm o potencial para torná-los verdadeiramente pan-resistentes e as infecções resultantes intratáveis (FALGENHAUER et al., 2016; LIU et al., 2016; SUZUKI et al., 2016).

O mecanismo de ação das polimixinas atua nas membranas celulares e no citoplasma das bactérias. O antibiótico liga-se nos fosfolipídios e lipopolissacarídeos, removendo moléculas de cálcio e magnésio que mantém a membrana estabilizada, causando o aumento

da permeabilidade da mesma, e levando à perda dos componentes celulares, com a consequentemente morte celular (GIRARDELLO, 2012).

Entretanto, estas mesmas enterobactérias desenvolveram mecanismo de resistência às polimixinas com a modificação do lipídio A, resultando na redução da afinidade da polimixina. Os relatos, até agora, são predominantemente quanto à resistência à colistina são via mutações cromossômicas e, apesar de relatos sobre surtos clonais, a resistência é muitas vezes instável, com um custo de aptidão à bactéria, demonstrando ser incapaz de se espalhar para outras bactérias (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS; NORDMANN, 2011).

O Sulfato de colistina (Polimixina E) é um antimicrobiano peptídico catiônico que possui atividade antibacteriana contra as bactérias Gram negativas, e atualmente é utilizado amplamente na suinocultura para a prevenção e tratamento de infecções causadas por enterobactérias. Alguns países permitem seu uso como aditivo zootécnico (RHOUMA, 2016). Porém, a OMS alerta que esta droga é considerada uma das substâncias antimicrobianas mais relevantes para a saúde humana, sendo a última escolha na terapia antimicrobiana utilizada em determinadas doenças ocasionadas por bactérias multirresistentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Todavia, os mecanismos de resistência estão ocorrendo de forma rápida por disseminação (por exemplo, NDM-1 Nova Delhi metalo- $\beta$ -lactamase-1), indicando que, com o advento da resistência à colistina transmissível, em progressão da Enterobactéria a resistência acabará inevitavelmente por se tornar global (KUMARASAMY, 2010). O surgimento de resistência à colistina mediada por plasmídeos na forma do MCR-1, relatada na pesquisa divulgada por LIU et al. (2016), torna-se um achado de significância global.

## **MÉTODO**

Os materiais analisados foram isolados clínicos entéricos de suínos provenientes de quatro fazendas do Distrito Federal. A coleta e transporte das amostras foram realizadas pelos alunos. inicialmente os swabs foram umedecidos em soro fisiológico estéril, os quais foram introduzidos no reto dos suínos, comprimindo-os em movimentos rotatórios suaves, em toda a extensão.

Em seguida, cada um dos swabs com as amostras foram depositados no meio de transporte Stuart. Após a coleta, os meios de transporte contendo os swabs com as amostras foram acondicionados e transportados em caixa de isopor com gelo reciclável.

A cultura primária de triagem de resistência e confirmação de resistência por microdiluição em caldo foram realizadas no laboratório de microbiologia do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB). Os swabs foram retirados do meio de transporte e inoculados por técnica de esgotamento de alça em placas de ágar Cromogênico Super Polimixina.

Estas placas foram incubadas entre 35 e 37 °C, por 48 horas. Após este período de incubação, foram retiradas da estufa e avaliadas quanto ao crescimento de colônias sugestivas de resistência a polimixina. Foram consideradas suspeitas, todas as colônias que cresceram no meio após o período de incubação, uma vez que o meio utilizado apresentava caráter de seletividade para isolamento de cepas, expressando a resistência pesquisada.

Em seguida cada colônia foi identificada por metodologia automatizada, utilizando equipamento Vitek 2, com o uso de cartões GN de identificação, utilizadas para identificar bactérias Gram negativas. O resultado obtido foi anotado para futura análise.

Por fim, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, que é considerado o padrão ouro na determinação da CIM, e tem como objetivo determinar quantitativamente a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento *in vitro* de um microrganismo.

As colônias de mesmas características foram utilizadas para inóculo nas placas de microdiluição CIM Polimixina B, que são painéis de poliestireno com 10 cavidades e tampa, contendo meio de cultivo seco, de coloração amarelo âmbar, composto de Mueller Hinton cátions ajustados. A cavidade identificada como CC (Controle de Crescimento) não contém antimicrobiano, enquanto que as demais cavidades contém diferentes concentrações de Polimixina B.

O procedimento técnico para a microdiluição consistiu na inoculação do microrganismo, com a ajuda de uma alça bacteriológica estéril, que foi encostada na superfície da colônia pura, e esta amostra foi suspensa em solução salina estéril, em tubo de ensaio estéril, de maneira a se obter uma turvação equivalente ao Tubo 0,5 da Escala de MacFarland (equivalente a  $10 \times 10^8$  UFC/mL), o qual foi identificado como Tubo 1.

A partir do Tubo 1 foi feita a diluição de 1:20 em solução salina estéril, em outro tubo de ensaio estéril, para se obter suspensão de concentração final de  $5 \times 10^6$  UFC/mL, que foi

identificado como Tubo 2. A partir do Tubo 2 foi realizada nova diluição de 1:10 em solução salina estéril, em um novo tubo de ensaio estéril, que foi identificado como Tubo 3, o qual ficou com concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL, do qual se retirou 100µL desta suspensão para se fazer o teste, ou seja, aplicando nos painéis, sendo um para cada amostra, também identificados com letras (A a S).

Após este procedimento, as placas de microdiluição foram incubadas em estufa por 18 horas a uma temperatura de 35°C. No dia seguinte, foi realizada a leitura das placas, contra a luz, pela observação de precipitado de bactérias no fundo da cavidade e/ou turvação do meio, e os resultados foram anotados. O PCR não pode ser realizado devido falta de cenário em decorrência da pandemia do atual ano.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cultura foi iniciada com o semeio de 50 amostras em placas de ágar Cromogênico Super Polimixina. A primeira leitura ocorreu 24 horas após o semeio, onde apenas 20 placas apresentaram crescimento de bactérias com resistência à polimixina, devido ao meio seletivo. As fermentadoras de lactose apresentaram colônias marrom azuladas escuras, enquanto que as não fermentadoras de lactose cresceram variando de incolor a lavanda claro (Figura 01). Todas as placas foram novamente incubadas por mais 24 horas, para que fosse realizada uma segunda leitura após 48 horas do semeio.

Figura 01: Resultado das placas sem crescimento (A), com crescimento puro (B) e crescimento impuro (C).



Fonte: Própria do autor, 2020.

Na segunda leitura, houve um crescimento acentuado das colônias nas 20 placas. Foi confirmado, também, que as 30 Placas, onde não havia apresentado crescimento inicial, continuaram sem apresentar crescimento de colônias, demonstrando resultado negativo, e foram descartadas.

Com o auxílio do aparelho Vitek 2 foi possível identificar as bactérias de 19 placas (Quadro 01). Isto ocorreu porque, uma das 20 placas submetidas a identificação (T) não apresentou aceitação no processo de reconhecimento, e portanto foi descartada após este processo.

Quadro 01: Identificação das bactérias encontradas nas amostras.

Placa	Identificação
A	<i>Morganella morganii</i>
B	<i>Escherichia coli</i>
C	<i>Providencia rettgeri</i>
D	<i>Morganella morganii</i>
E	<i>Providencia alcalifaciens</i>
F	<i>Providencia rettgeri</i>
G	<i>Providencia rettgeri</i>
H	<i>Escherichia coli</i>
I	<i>Shigella sonnei</i>
J	<i>Proteus vulgaris</i>
K	<i>Escherichia coli</i>
L	<i>Providencia alcalifaciens</i>
M	<i>Escherichia coli</i>
N	<i>Methylobacterium spp.</i>
O	<i>Providencia rettgeri</i>
P	<i>Providencia rettgeri</i>

Q	<i>Providencia rettgeri</i>
R	<i>Providencia rettgeri</i>
S	<i>Morganella morganii</i>

Fonte: Própria do autor, 2020.

Cabe ressaltar que dentre as bactérias identificadas a maioria apresenta resistência intrínseca para a polimixina (*Morganella sp.*, *Proteus sp.*, *Providencia sp.* e *Methylobacterium sp.*), ou seja, tem resistência determinada em seu componente genético, enquanto 2 gêneros não possuem esta característica (*Escherichia coli* e *Shigella sonnei*) (ANVISA, 2020).

Todas as amostras consideradas resistentes à polimixina no teste de microdiluição (Figura 02), isto é, aquelas com concentração inibitória mínima > 4 µg/dL, foram separadas e somente aquelas bactérias (Quadro 02) que não possuem a característica de resistência intrínseca (*Escherichia coli* e *Shigella sonnei*) foram congeladas para serem submetidas à pesquisa do gene MCR-1 por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Figura 02: Placa de microdiluição utilizada no trabalho.



Fonte: Própria do autor, 2020.

Quadro 02: Bactérias isoladas e o resultado do MIC.

Placa	Identificação	CIM (µg/dL)
A	<i>Morganella morganii</i>	1
B	<i>Escherichia coli</i>	-
C	<i>Providencia rettgeri</i>	> 32
D	<i>Morganella morganii</i>	> 32

E	<i>Providencia alcalifaciens</i>	4
F	<i>Providencia rettgeri</i>	16
G	<i>Providencia rettgeri</i>	> 32
H	<i>Escherichia coli</i>	0,5
I	<i>Shigella sonnei</i>	> 32
J	<i>Proteus vulgaris</i>	> 32
K	<i>Escherichia coli</i>	> 32
L	<i>Providencia alcalifaciens</i>	-
M	<i>Escherichia coli</i>	-
N	<i>Methylobacterium spp.</i>	Inválido
O	<i>Providencia rettgeri</i>	> 32
P	<i>Providencia rettgeri</i>	0,125
Q	<i>Providencia rettgeri</i>	> 32
R	<i>Providencia rettgeri</i>	> 32
S	<i>Morganella morganii</i>	> 32

Fonte: Própria do autor, 2020.

É importante ressaltar, que por serem moléculas anfipáticas tensoativas, as polimixinas interagem com as moléculas de polissacarídeos que estão presentes na membrana externa das bactérias, promovendo o sequestro do cálcio e do magnésio, os quais são necessários para promover a estabilidade da membrana, desorganizando-a e modificando a sua permeabilidade, possibilitando o vazamento do conteúdo intracelular. Entretanto, o uso indiscriminado destes antimicrobianos pode levar ao surgimento de microrganismos super resistentes, que podem se acumular e disseminar sua resistência, causando um grande e sério risco para a população, pois reduzem opções de fármacos existente como efetivos ao controle e tratamento de infecções causadas por estes microrganismos. O processo de resistência aos antimicrobianos, de acordo com os estudos apresentados, pode estar relacionado a uma característica intrínseca, que é identificada em certas espécies de bactérias, podendo estas

resistirem à ação de determinado antibiótico, devido a uma característica estrutural ou funcional intrínseca daquela espécie. Esta resistência intrínseca também pode estar relacionada ao resultado de mutações, que podem ocorrer no processo replicação celular ou serem induzidas por meio de agentes mutagênicos, tais como: radiações ionizantes e não ionizantes, agentes alquilantes, ou ainda espécies reativas de oxigênio (EROS). A resistência destes microrganismo também pode correr pela aquisição de material genético exógeno, que antes estavam presente em outros microrganismo, apresentando genes de resistência e que foram propagados por mecanismos de transferência gênica de forma horizontal, mais conhecidos como plasmídeos, através da processo de conjugação bacteriana, que é verificado no momento da transdução (COSTA, 2017).

Um mecanismo identificado, e qualificado como o responsável pela transferência horizontal de resistência à polimixina, o gene MCR-1, que foi relatado pela primeira vez em estudos realizados em 2015 na China. O MCR-1 foi detectado em isolados de *K. pneumoniae* e *Escherichia coli* obtidas em amostras de isolados clínicos, carne crua e animais entre o período de 2011 a 2014. Esta proteína, MCR-1, faz parte do grupo das enzimas fosfoetanolamina transferase, que uma vez adquirida tem como resultado a adição de fosfoetanolamina ao lipídeo A, o que torna o LPS mais catiônico, e conseqüentemente provoca a redução da ligação da polimixina na membrana das bactérias conferindo-lhes resistência. A produção de MCR-1 proporciona um aumento de quatro a oito vezes os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) das polimixinas, o que torna suficiente para conferir resistência às polimixinas em membros da ordem *Enterobacteriales* (OLIVEIRA, 2020).

O primeiro caso brasileiro de MCR-1 detectado em um humano, foi observado no estado do Rio Grande do Norte. Foi isolado da amostra uma cepa de *E. coli* produtora de ESBL (do tipo CTX-M resistente à colistina), est foi encontrada na ferida do pé do paciente diabético. Outras publicações identificaram MCR-1 (Figuras 03 e 04) em seres humanos no estado de São Paulo, Espírito Santo, Pernambuco e Rio Grande do Sul, e existem relatos em publicação que não descreveram o local do isolamento. Foi no estado de São Paulo que se detectou o gene MCR-1 em *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. na carne de frango, *Salmonella* spp. em carcaças de carne suína. Neste estado também observou-se *Escherichia coli* positiva para MCR-1 também em praias públicas e amostras de cepas contidas em aves migratórias (pinguins), que apareceram naquela região. Já na região nordeste, *Escherichia coli* portadora de MCR-1 foi localizada em bovino saudável e também no meio ambiente em um ecossistema de mangue



poluído. No estado do Rio Grande do Sul, grande produtor de carne suína e aves, foram identificadas cepas do gênero *Salmonella* positivas para MCR-1 na carne congelada de suínos, e isolados de *E. coli* detectados em aves (frangos). Em Minas Gerais *E. coli* foi observada e isolada em um suíno com diarreia, onde se confirmou positivo para MCR-3.12 uma variante do gene MCR-3 (OLIVEIRA, 2020).

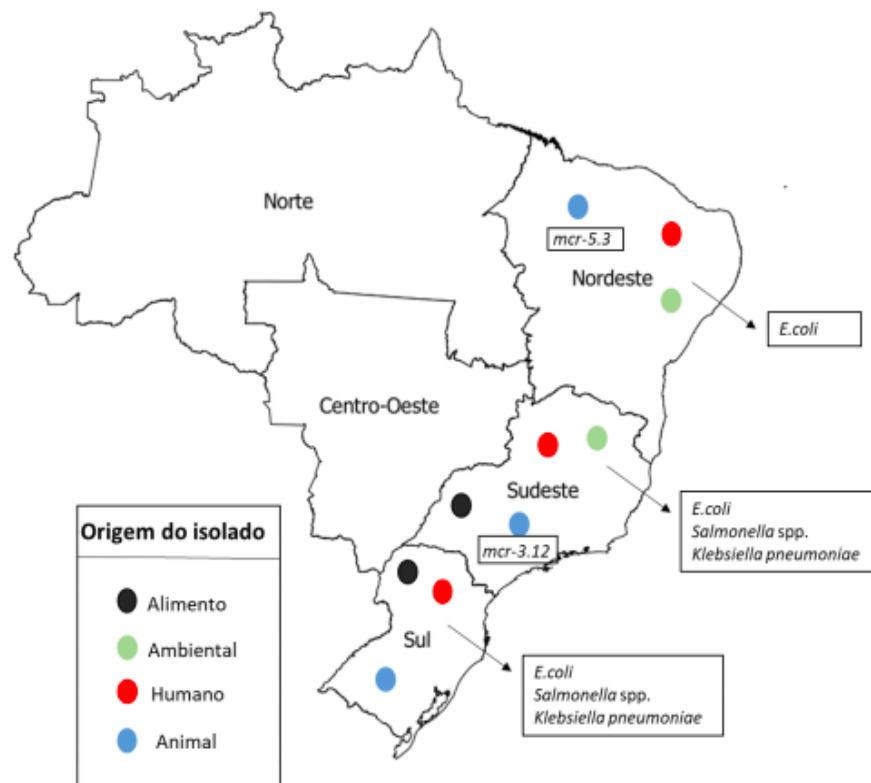
Figura 03: Microrganismos descritos no Brasil, que apresentaram resistência à colistina (polimixina) através dos genes MCR.

Linagem	Sítio	Gene	Estado	Ano	Referência
<i>Escherichia coli</i>	Paciente	<i>mcr-1</i>	Rio Grande do Norte	2016b	Fernandes <i>et al.</i>
<i>Escherichia coli</i>	Paciente	<i>mcr-1</i>	Recife	2017	Rocha <i>et al.</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Paciente	<i>mcr-1</i>	Espírito Santo	2017	Aires <i>et al.</i>
<i>Escherichia coli</i>	Paciente	<i>mcr-1</i>	São Paulo	2017b	Rossi <i>et al.</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Paciente	<i>mcr-1</i>	Rio Grande do Sul	2017	Dalmolin <i>et al.</i>
<i>Escherichia coli</i>	Paciente	<i>mcr-1</i>	Rio Grande do Sul	2018	Lorenzoni <i>et al.</i>
<i>Escherichia coli</i>	Animal	<i>mcr-3</i>	Minas Gerais	2018	Kieffer <i>et al.</i>
<i>Salmonella enterica</i>	Animal	<i>mcr-1</i>	São Paulo	2019	Moreno <i>et al.</i>

Bactérias descritas em ambiente nacional que possuem resistência à colistina através do gene *mcr*.

Fonte: (FABRIN; VIZZOTTO, 2019)

Figura 04: Distribuição do gene MCR nos estados brasileiros, de acordo com as espécies e origem dos isolados



Fonte: OLIVEIRA, 2020.

Os microrganismos portadores de resistência intrínseca ou de genes de resistência adquiridos, que são fatores bioquímicos que tais microrganismos podem expressar, favorecem seu desenvolvimento, pois reduzem a competição, por espaço e nutrientes, no meio com aquelas espécies que não possuem mecanismos de resistência. Este efeito da resistência é a causa de maior da pressão seletiva que os antibióticos passam a impor ao meio (COSTA, 2017; SILVA, 2018).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A resistência bacteriana aos antibióticos é atualmente um dos problemas de saúde pública global mais relevantes a nível global, dado que apresenta consequências clínicas e econômicas preocupantes, estando associada ao uso inadequado de antibióticos. A aquisição de mecanismos de resistência diminui ou inibe a ação do antibiótico.

A colistina é um antibiótico polipeptídico que foi extensivamente utilizado, a nível mundial, em medicina humana e veterinária. Na medicina humana, a elevada incidência de nefrotoxicidade e de neurotoxicidade desencadeou o declínio da utilização sistêmica da colistina. No entanto, nas últimas décadas, o elevado número de surtos hospitalares provocados por bactérias Gram-negativo, resistente a múltiplos fármacos, levou os clínicos a reintroduzir a colistina sistêmica, como fármaco de último recurso.

A colistina tem sido amplamente aplicada na medicina veterinária e pecuária, para o tratamento e prevenção de doenças infecciosas, e tem sido reconhecido, através de estudos ao longo dos anos, como promotor de crescimento em aves e suínos. Com isto, o aparecimento de altas taxas de cepas de *E. coli*, que produzem MCR, podem ser explicadas pelo uso indiscriminado deste antimicrobiano, e em particular nas regiões produtoras que a utilizam para tratamento de aves, suínos e bovinos.

Sabe-se que o uso da colistina na medicina veterinária está sendo questionado e analisado. Em países com grande destaque na área da pecuária, como Brasil e China, a colistina como aditivo alimentar para animais foi proibida. Dessa forma, há necessidade de um conhecimento específico da resistência bacteriana em cada micro-ambiente, inclusive no Centro-Oeste, justamente para revelar a possível existência de resistência antimicrobiana à colistina mediada pelo gene MCR-1 presente em plasmídeo de enterobactérias, por meio da análise de amostras fecais de suínos do Distrito Federal.

Faz-se necessário ampliar o estudo, visto que o mesmo não foi capaz de concluir se há a presença do gene de interesse, pois a pandemia impediu que o PCR fosse realizado. Este estudo pode ajudar em novas estratégias de enfrentamento e mapeamento da resistência bacteriana, podendo auxiliar na construção de propostas resolutivas pelas autoridades de saúde pública.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM E.P; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Infectious Diseases Society of America**, v. 10, n. 4, p. 677-678, jul./ago. 1940.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Antimicrobianos - principais grupos disponíveis para uso clínico**. 2007. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/polimixinas3.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/polimixinas3.htm)>. Acesso em: 15 outubro 2020.

CANNATELLI A. et al. *In vivo* emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5521–5526, nov. 2013.

CASTANHEIRA, B. A. M. G. et al. **Mecanismos de resistência a antibióticos**. 2013. Dissertação (Mestrado) do Programa de Estudos em Ciências Farmacêuticas da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

COSTA, Fagner James Martins Dantas. **Resistência à polimixina B em bactéria Gram-negativas carbapenemos resistentes isoladas em hospitais do Rio Grande do Norte**. 2017. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

ENGELKIRK, P. G.; DUBEN-ENGELKIRK, J. **Burton's Microbiology for the Health Sciences**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Company, 1992.

FALAGAS M.E, KARAGEORGOPOULOS D. E.; NORDMANN, P. Therapeutic options for infections with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. **Future Microbiology**, v. 6, n. 6, pg. 653–66, jun. 2011.

FALGENHAUER, L. et al. Colistin resistance gene mcr-1 in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. **Lancet Infectious Disease**, v. 16, n. 3, p. 282-283, mar. 2016.

FABIN, G.; VIZZOTTO, B. S. **Resistência bacteriana a polimixinas: Uma Revisão dos atuais panoramas Brasileiros e Mundial**. Revista eletrônica Disciplinarium Scientia, v. 20, n. 2, p. 321-339, jun. 2019.

GIRARDELLO R. G. A. C. Resistência às polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 2, n. 2, p. 66-69, jul. 2012.

KEMPF, I. et al. What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe? **International journal of antimicrobial**, v. 42, n.5, p. 379–383. nov. 2013.

KIRBY W. M. M. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. **Science**, v. 99, n.2579, p. 452-453, jun. 1944.

KUMARASAMY K. K. et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infectious Disease**, v. 10, n. 9, p. 597-602, ago. 2010.

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

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

OLIVEIRA, F. A. **Detecção do gene MCR-1 em enterobactérias resistentes à colistina isoladas de amostras clínicas provenientes do complexo hospitalar da UNICAMP**. Dissertação (Mestrado) do Programa de estudos na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, 2020.

QUEIROZ, N. S. **O uso indiscriminado de antibióticos na ecologia das bactérias-antibiótico-resistentes associadas à problemática da infecção hospitalar: conhecimento e prática de profissionais de saúde, a luz da ética da responsabilidade de Hans Jonas**. Tese (Pós-Graduação) no Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

SILVA, G. J. Resistência à colistina e sua disseminação: implicações em saúde pública. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, v. 10, n. 1, p. 47-52, 2018.

SUZUKI, S. et al. Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene mcr-1. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 3, p. 284-285, jan. 2016.

TENOVER F. C. Novel and emerging mechanisms of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. 576-581, set. 1991.

TENOVER, F. C.; HUGHES, J. M. The Challenges of Emerging Infectious Diseases Development and Spread of Multiply-Resistant Bacterial Pathogens. **JAMA**, v. 275, n. 4, p. 24-31, jan. 1996.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Switzerland, 2014. Disponível em: <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf)>. Acesso em: 15 maio 2020.