

## INVESTIGAÇÃO DO GENE *MCR-1* EM ISOLADOS RESISTENTES À COLISTINA NA REGIÃO DE SANTA MARIA-RS<sup>1</sup>

### *MCR-1 GENE INVESTIGATION IN COLISTINE-RESISTANT ISOLATES IN THE REGION OF SANTA MARIA, RS*

Larissa da Silva Silveira<sup>2</sup>, Aline Rossato<sup>3</sup>, Thaís da Costa Orlando<sup>3</sup>,  
Thobias Toniolo de Souza<sup>3</sup>, Luciele de Menezes da Conceição<sup>3</sup>,  
Hemilaine Silveira de Almeida<sup>4</sup>, Leandro Bolzan<sup>3</sup>, Bruno Stefanello Vizzotto<sup>5</sup>

#### RESUMO

A colistina é considerada o último recurso para tratamento de infecções causadas por bacilos gram-negativos multirresistentes. A presença do gene *mcr-1* mediado por plasmídeo representa um dos mecanismos que confere resistência a essa droga, sendo considerado de fácil propagação entre as bactérias. Assim, o presente estudo teve como objetivo determinar a ocorrência de resistência à colistina em microrganismos isolados a partir do trato gastrointestinal de pacientes atendidos na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Foram analisadas 718 amostras fecais por meio de metodologias fenotípica e molecular para a pesquisa do gene de resistência *mcr-1*, assim como análises do perfil de resistência dos isolados recuperados. Foram detectadas 32 cepas de microrganismos resistentes à colistina (4,5 %) pelos métodos de detecção fenotípicos, porém não foi encontrada a presença do gene *mcr-1*. Todas as cepas apresentaram CIM elevada para colistina, sendo detectada uma maior resistência à Ampicilina e Ampicilina+Sulbactam. O perfil de resistência encontrado pode ser atribuído a outros mecanismos, como o interrupção do gene *mgrB*. Enfatiza-se a necessidade de estudos moleculares complementares para confirmação do real mecanismo de resistência.

**Palavras-chave:** Enterobacteriales, Polimixina E, Fezes.

#### ABSTRACT

*Colistin is considered the last resource for the treatment of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacilli. The presence of the plasmid-mediated mcr-1 gene represents one of the mechanisms that confers resistance to this drug that is considered of easy propagation among bacteria. Thus, the present study aimed to determine the occurrence of resistance to colistin in microorganisms isolated from the gastrointestinal tract of patients treated in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. 718 fecal samples were analyzed by means of phenotypic and molecular methodologies for the mcr-1 resistance gene, as well as the analysis of the resistance profile of the recovered isolates. Thirty-two strains of colistin-resistant microorganisms (4.5%) were detected by phenotypic detection methods, but the presence of the mcr-1 gene was not found. All strains showed an elevated MIC for colistin, and a higher resistance to Ampicillin and Ampicillin + Sulbactam was detected. The resistance profile found can be attributed to other mechanisms, such as the interruption of the mgrB gene. It is important to highlight the need for complementary molecular studies to confirm the real mechanism of resistance.*

**Keywords:** *Enterobacteriales, Polymyxin E, Stool.*

<sup>1</sup> Trabalho Final de Graduação

<sup>2</sup> Autor. Acadêmica do curso de Biomedicina. Universidade Franciscana - UFN. E-mail: larissasilveirars@outlook.com

<sup>3</sup> Colaboradores. Acadêmicos do curso de Biomedicina. Universidade Franciscana - UFN.

<sup>4</sup> Colaboradores. Profissionais Biomédicos do Laboratório de Análises Clínicas - LABIMED. Santa Maria- RS.

<sup>5</sup> Orientador. Docente do curso de Biomedicina. Universidade Franciscana - UFN. E-mail: bvizzotto@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana é considerada uma ameaça global à saúde pública. Diante disso, políticas de controle de sua utilização necessitam imediatamente ser implementadas e aprimoradas (JELOVCAN et al, 2016). Os antimicrobianos vêm perdendo cada vez mais seu impacto no controle das infecções bacterianas. Um exemplo disso é a resistência à colistina (ou Polimixina E), recentemente reintroduzida na prática médica, a qual constitui um dos últimos recursos para o tratamento de bactérias Gram-negativas multirresistentes. Esta representa um potente antimicrobiano bactericida peptídico policatiônico cíclico que interage com moléculas de lipopolissacarídeos aniônicos (LPS). Ultimamente, algumas pesquisas têm trazido relatos de microrganismos apresentando resistência a essa classe de antimicrobianos, o qual representa um mecanismo de resistência adquirida, determinada pela presença do gene plasmidial *mcr-1*, característica esta que facilita ainda mais sua disseminação entre diferentes espécies bacterianas (GALES, JONES, SADER, 2011; HIGUITA-GUTIERREZ e QUICENO, 2017). O gene *mcr-1*, descoberto na China, já foi relatado em estudos realizados em países da Europa, Ásia e África (LIU et al; 2016). No Brasil foi identificado pela primeira vez em cepas de *Escherichia coli* isoladas de animais de produção (FERNANDES et al; 2017). Esse gene codifica uma proteína da família fosfoetanolamina transferase que modifica o componente do lipídeo A do LPS, conferindo nível de resistência à colistina com MIC = 4-8 mg / L. (CASTANHEIRA et al, 2016; LUO et al, 2017).

Um dos fatores que contribuiu e também acelerou este processo de adaptação e resistência foi o uso e descarte indiscriminado de antimicrobianos. A colistina, devido a sua elevada toxicidade, tem seu uso proibido no Brasil, entretanto em outros países é utilizada por exemplo em criações de gado, porcos e frangos de corte (BRAUER et al, 2016; CUPERTINO, 2016; LIU et al, 2016). A fim de promover um maior crescimento em um curto espaço de tempo, esta prática tem contribuído negativamente, gerando reservatórios de genes de resistência que são transmitidos aos seres humanos (BONTRON, POIREL, NORDMANN 2016; FERNANDES, AMADOR, PRUDÊNCIO, 2013; GIRARDELLO e GALES, 2012). O primeiro relato da presença do gene *mcr-1* no Brasil ocorreu em 2016, em animais de produção das regiões Sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e Sul (Paraná e Santa Catarina); naquela ocasião, foi considerado uma urgência epidemiológica e um alerta para o agronegócio, visto que o país é um grande produtor e exportador de produtos de origem animal (FERNANDES et al; 2017).

Métodos moleculares e microbiológicos de detecção de perfis de resistência baseados na análise da estrutura genética de microrganismos, são utilizados para identificação de fontes de transmissão, vigilância epidemiológica, bem como investigações de surtos na população causados por estes microrganismos. Isso ocorre, devido aos recentes relatos acerca da detecção de microrganismos apresentando resistência à Colistina na cidade de Santa Maria-RS e sua crescente disseminação (RAMPELOTTO et al, 2017), faz-se necessário estudos epidemiológicos a fim de detectar indivíduos colonizados/infectados por Enterobactérias transportando o gene *mcr-1* afim de garantir

o início adequado e precoce da terapia específica, bem como a pronta implementação das medidas de controle de infecção mais apropriadas (HEDDINI et al, 2009). Desta forma, o presente estudo teve como objetivo determinar a ocorrência de resistência à colistina em cepas da família *Enterobacteriaceae* isoladas a partir de amostras fecais, investigar a presença do gene *mcr-1* como possível causador de tal resistência além da identificação dos microorganismos encontrados e determinar também a taxa de indivíduos infectados/colonizados por estes microorganismos em Santa Maria-RS.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Franciscana (CEP-UFN), a qual foi autorizada sob registro nº CAAE: 89678618.7.0000.5306. Foram analisados espécimes clínicos fecais armazenados em swabs de transporte tipo Stuart, cedidos por um laboratório clínico da cidade de Santa Maria - RS, durante o período de março de 2017 a junho de 2018.

## CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Primeiramente, as amostras clínicas fecais foram enriquecidas por meio da inoculação dos swabs em 1mL de Caldo Luria Bertani (LB) contendo sulfato de colistina (2µg/mL), sendo então incubados a 37°C por 24h. Uma alçada dos caldos de enriquecimento foram semeadas em Agar MacConkey acrescido de colistina (4µg/mL) sendo então incubados novamente a 37° por 24h. A partir do crescimento microbiano foi realizada a identificação bioquímica destes isolados utilizando métodos bioquímicos convencionais, assim como a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para colistina e antibiograma pelo método de disco- difusão, sendo testados os seguintes antimicrobianos: amicacina (30 µg), ampicilina + sulbactam (10/10 µg), ampicilina (10 µg), aztreonam (30 µg), cefepime (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefoxitina (30 µg), ceftazidima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefuroxima (30 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg) e meropenem (10 µg). As análises do perfil de resistência foram realizadas de acordo com CLSI, 2013, e a CIM para Colistina foi determinada segundo *breakpoints* publicados pelo EUCAST, 2015 o qual interpreta uma CIM ≤ 2µg/mL como suscetível e CIM > 2µg/mL como resistente. Os microorganismos suspeitos foram armazenados em Glicerol 20% + TSB a -80°C para análises posteriores (NORDMANN, JAYOL, POIREL, 2017).

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A análise molecular para confirmação da presença do gene *mcr-1* para os isolados que apresentaram crescimento na detecção fenotípica foi realizada por meio de PCR em Tempo Real utilizando Sybr Green, onde o DNA bacteriano foi obtido por meio de extração por fervura a

100°C e submetido à detecção em uma reação composta por um volume de 24µL contendo 12,5µL de qPCR Master Mix (Ludwig Biotec, Porto Alegre-RS), 1 µL dos primers Forward e Reverse (*mcr-1-qF2* 5'-TGGCGTTCAGCAGTCATTAT-3' e *mcr-1-qR2* 5'- AGCTTACCCACCGAGTAGAT-3'), 9,5 µL de H<sub>2</sub>O Ultra-pura e 1 µL do DNA bacteriano, sendo utilizado um gBlock (IDT, Illinois, USA) contendo o amplicon de 97pb como controle positivo da reação. As condições de termociclagem utilizadas foram: 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 1min, 60°C por 1min e 72°C por 1min, acrescidas de um passo de extensão final a 72°C por 10 min, em termociclador Esco<sup>®</sup> Swift Spectrum 48 Real Time (BONTRON, POIREL, NOEDMANN 2016). A detecção do gene 16SrDNA, como controle interno da reação, foi realizada em PCR convencional em um volume de 25µL contendo 22,5µL de Mix para PCR (Ludwig Biotec, Porto Alegre-RS), 1 µL dos primers Forward e Reverse (16S-F 5'ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT3' e 16S-R 5' ATTACCGCGGCTGCTGGC 3') e 1 µL do DNA bacteriano, gerando um amplicon de 180 pb. Esses dados foram detectados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% a 80V por 1h e revelados em transiluminador UV (Alpha Innotech<sup>®</sup>) (KANG et al, 2017).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 718 amostras clínicas fecais foram analisadas no intuito de investigar a presença do gene *mcr-1* pelos métodos fenotípico e molecular. Baseadas nos métodos de detecção fenotípico, 32 cepas (4,5%) apresentaram crescimento nos meios de cultura utilizados, sendo desprezados os microrganismos com resistência intrínseca à colistina (n=16). Destes, *E. coli* (n=11) representou o microrganismo com o maior índice de recuperação, seguido de *K. pneumoniae* (n=9), *Enterobacter* spp. (n=3), *P. aeruginosa* (n=3) e outros bacilos gram-negativos (n=6).

Na análise do antibiograma, pode-se averiguar o perfil de resistência dos isolados analisados, como mostrado na Tabela 1, a seguir. Em relação aos carbapenêmicos testados, apenas os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentaram resistência ao Imipenem (27% e 22%, respectivamente) sendo suscetíveis ao meropenem, e para cefepime, uma cefalosporina de 4<sup>a</sup> geração, todos os isolados apresentaram sensibilidade. Os antimicrobianos que apresentaram as maiores taxas de resistência foram Ampicilina e Ampicilina+Sulbactam.

**Tabela 1** - Perfil de resistência determinado pelo antibiograma para os microrganismos isolados.

Atbs*	<i>E. coli</i> (n=11; 34,37%)**	<i>K. pneumoniae</i> (n=9; 28,12%)	<i>Enterobacter spp.</i> (n=3; 9,37)	<i>P. aeruginosa</i> (n=3; 9,37)	Outros (n=6; 18,35)
AMI	0	11	0	34	27
ASB	18	89	33	0	35
AMP	91	100	33	34	27
ATM	0	0	0	0	0
CPM	0	0	0	0	0
CTX	37	56	0	66	34
CFO	27	22	34	100	33
CAZ	0	0	0	0	22
CRO	0	0	0	0	0
CRX	63	67	0	100	33
GEN	0	0	0	0	0
IPM	27	22	0	0	22
MER	0	0	0	0	0

\*Atbs: antimicrobianos.

\*\* Resultados expressos em porcentagem de isolados resistentes. AMI Amicacina, ASB Ampicilina + Sulbactam, AMP Ampicilina, ATM Aztreonam, CPM Cefepime, CTX Cefotaxima, CFO Cefoxitina, CAZ Ceftazidima, CRO Ceftriaxona, CRX Cefuroxima, GEN Gentamicina, IPM Imipenem, MER Meropenem

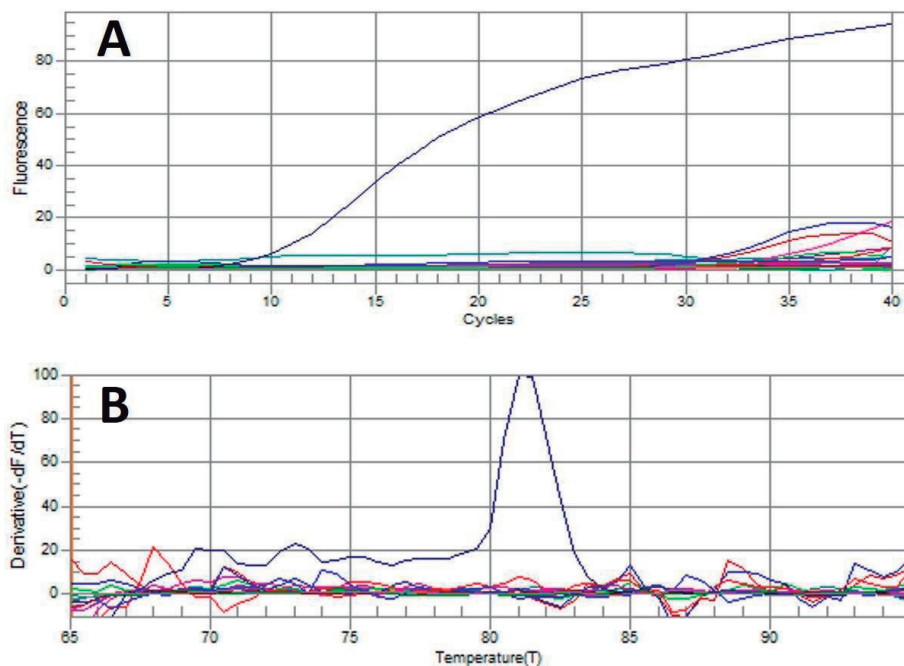
A análise da CIM para colistina pelo método de microdiluição demonstrou um elevado grau de resistência para os isolados identificados, sendo que 15 cepas apresentaram CIM  $\geq$  128  $\mu\text{g/mL}$ , seguidas de 14 cepas com CIM igual a 16  $\mu\text{g/mL}$  e 8  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 2).

**Tabela 2** - Determinação da CIM para colistina frente aos isolados identificados no estudo.

Isolados	Concentração de Colistina ( $\mu\text{g/mL}$ ) / N° de isolados									
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
<i>E. coli</i> (n=11)	0	0	0	0	0	2	2	1	1	5
<i>K. pneumoniae</i> (n=9)	0	0	0	0	0	3	3	0	0	3
<i>Enterobacter spp.</i> (n=3)	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1
<i>P. aeruginosa</i> (n=3)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2
Outros (n=6)	0	0	0	0	0	2	0	0	0	4
Total (n=32)	0	0	0	0	1	7	7	1	1	15

Em relação às análises moleculares realizadas por meio de PCR, observou-se a presença de banda correspondente ao gene 16SrRNA para todas as amostras analisadas, validando o teste. Da mesma forma, para a pesquisa do gene *mcr-1* por meio da técnica de qPCR, observou-se a presença da curva de amplificação para o controle positivo, porém nenhum dos 32 isolados apresentou amplificação correspondente ao gene de resistência (Figura 1).

**Figura 1** - Detecção do gene *mcr-1* por qPCR para os 32 isolados identificados no estudo. **A.** Gráfico de amplificação, demonstrando a detecção do controle positivo. **B.** Determinação da Temperatura de *melting* para o amplicon gerado, correspondente ao gene *mcr-1*.



Como mencionado anteriormente a resistência antimicrobiana é considerada uma ameaça global à saúde pública necessitando de estudos para elucidação de tais mecanismos, Entretanto no Brasil, há poucos relatos da detecção deste mecanismo de resistência a colistina a partir de isolados clínicos de amostras fecais, sendo o mesmo já observados em quadros de septicemia (ROSSI et al., 2017; ZAVASCKI et al., 2018), pacientes imunocomprometidos (OLIVEIRA et al., 2018), assim como em análises ambientais (FERNANDES et al, 2017). Na cidade de Santa Maria - RS há relatos de resistência à colistina partir de hemoculturas de neonatos (RAMPELOTTO et al.,2017) e de vários espécimes clínicos de pacientes admitidos em um hospital universitário (SANTOS, ROCCA, HÖRNER, 2016).

É de extrema importância ressaltar que entre os fatores que contribuem e aceleram o processo de adaptação e resistência a Colistina está o uso e descarte indiscriminado na criação de gado, porcos e frangos como promotor de crescimento (GIRARDELLO e GALES, 2012; FERNANDES, AMADOR, PRUDÊNCIO, 2013; BRAUER et al, 2016; BONTRON, POIREL, NORDMAN 2016; CUPERTINO, 2016; LIU et al, 2016).

No presente estudo foi detectada uma prevalência da espécie *E. coli* apresentando resistência elevada à colistina. Terveer et al., 2017 realizaram uma pesquisa analisando amostras fecais de pacientes internados em um hospital holandês, no intuito de averiguar a prevalência do gene *mcr-1* em isolados bacterianos. Obtiveram uma prevalência de 0,35% na detecção do gene a partir de 02 espécimes isolados de pacientes transplantados renais, sendo 01 isolado não cultivável e 01 isolado identificado como *E. coli*, apresentando CIM  $\leq 0.25\mu\text{g/mL}$  para colistina, sendo fenotipicamente sus-

cetível. No estudo realizado por Saly et al., 2017 em um hospital universitário no oeste da França, foi detectada uma prevalência de 1,4% de microrganismos isolados à partir de swabs retais carregando o gene *mcr-1*, com CIMs entre 4 e 128 ug/mL, representado pelas espécies *E.coli* (n=3), *K. pneumoniae* (n=2), *Enterobater cloacae* (n=2), *Raoultella ornithinolytica* (n=1) e *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1). Nijhuis et al., (2016) demonstram a detecção do gene *mcr-1* a partir de swabs fecais de vigilância e sítios clínicos diversos de 45 isolados com resistência à colistina recuperados de 39 pacientes diferentes. Desses, 23 isolados foram representativos da espécie *E. coli*, seguidos das espécies de *K. pneumoniae* (n=7), *Enterobacter* spp. (n=5), *K. oxytoca* (n=3), *P. aeruginosa* (n=2), *Vibrio* spp. (n=2), *Acinetobacter* spp. (n=1) e *Aeromonas hydrophila* (n=1), onde a prevalência foi semelhante a encontrada em nossa pesquisa. Donà et al, (2017) detectaram uma incidência de 8,3% de indivíduos colonizados por cepas de *E. coli* transportando o gene *mcr-1* partir de amostras fecais.

Em um estudo desenvolvido por Braun et al, (2018) com isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2 recuperadas de culturas de sangue entre 2009 e 2015, observou-se um aumento de 30,6% nas taxas de resistência à colistina, porém, nenhum dos 36 isolados avaliados transportavam o gene *mcr-1*, assim como o presente estudo onde foi detectado um alto índice de resistência, porém sem a presença do gene. Em oposição, detectou-se a interrupção do gene *mgrB* por uma sequência de inserção em 33,3% destes isolados, o qual confirmou o mecanismo mais frequente de resistência durante terapia com polimixina B naquele local. As análises realizadas por Ferreira et al, (2018) também relatam a interrupção do gene *mgrB* por elementos de inserção como causador do elevado nível de resistência à colistina observado. Esta provavelmente pode ser uma das explicações para o mecanismo de resistência observado nos isolados bacterianos analisados em nosso estudo, a qual enfatiza a necessidade de análises por sequenciamento da região do gene *mgrB* para comprovação do exato mecanismo de resistência.

As modificações na membrana externa incluem alterações dos lipopolissacarídeos (LPS) que são os alvos iniciais das polimixinas. A adição de grupos catiônicos, como 4-amino-4-desoxy-L-arabinose (L-Ara4N) e fosfoetanolamina (PEtn) ao LPS é responsável pela resistência adquirida na família Enterobacteriales. Também existe uma gama de genes e operons que apresentam envolvimento na modificação dos LPS assim como genes reguladores (gene *mgrB*) e codificadores de proteínas envolvidas nos sistemas de dois componentes PmrAB (genes *pmrA* e *pmrB*) e PhoPQ (genes *phoP* e *phoQ*) (MOFFATT et al., 2010; OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017). PmrAB e PhoPQ são influenciados por alterações de pH do meio e concentrações de íons ferro, cálcio e magnésio, onde alterações por meio de mutações dos genes *pmrA* e *pmrB*, bem como alterações no sistema PhoP/PhoQ, estão diretamente envolvidos na modificação do lipídio A, que assim como a perda de função do gene *phoQ*, representam importantes mecanismos de regulação de resistência às polimixinas onde ambos os sistemas promovem modificações em expressões alterando o fenótipo de resistência (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014).

Outra forma de resistência que ocorre é quando as bactérias diminuem a concentração de antimicrobianos no interior da célula através do bombeamento ativo dessas drogas do meio intracelular para o meio extracelular, conhecido como bomba de efluxo. A bactéria passa a produzir proteínas de membrana que funcionam como uma bomba, expulsando ativamente o antimicrobiano para fora da bactéria, em decorrência, a droga não atinge concentrações intracelulares suficientes para agir, desempenhando um significativo papel na resistência intrínseca e adquirida de vários micro-organismos Gram-negativos (TORTORA, FUNKE, CASE et al, 2016; CHOWDHARY, SHARMA, MEIS, 2017).

## CONCLUSÃO

Dos 32 isolados com resistência a colistina analisados neste estudo para a presença do gene *mcr-1*, nenhum demonstrou transportar o gene em questão, sendo que o perfil de resistência encontrado pode ser atribuído a outros mecanismos. Existem na literatura diversos relatos de diferentes mecanismos de resistência às Polimixinas, como por exemplo modificações na membrana externa (alterações em sistemas componentes PmrAB/PhoPQ e no lipídio A) e sistemas de bombas de efluxo. Desta forma, o presente trabalho enfatiza a necessidade de estudos moleculares complementares para confirmação do real mecanismo de resistência encontrado, levando em consideração a alta taxa de prevalência detectada, assim como a importância da implementação de um sistema de vigilância ativo para a detecção precoce de pacientes colonizados por estes microrganismos e que estejam internados em Unidades de Terapia Intensiva, os quais podem servir como foco de disseminação.

## REFERÊNCIAS

BONTRON, S; POIREL, L; NORDMANN, P. Real-time PCR for detection of plasmid-mediated polymyxin resistance (*mcr-1*) from cultured bacteria and stools. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2318-2320, Mar., 2016.

BRAUER, A; TELLING, K; LAHT, M; KALMUS, P; LUTSAR, I; REMM, M; KISAND, V; TENSON, T. Plasmid with Colistin Resistance Gene *mcr-1* in Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase- Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Pig Slurry in Estonia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6933-6936, Aug., 2016.

BRAUN, G; CAYÔ, R; MATOS, A. P; FONSECA, J. M; GALES, A. C. Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period. **International journal of antimicrobial agents**, v. 51, n. 3, p. 522-527, Aug., 2018.



CASTANHEIRA, M; GRIFFIN, M. A; DESHPANDE, L. M; MENDES, R. E; JONES, R.N; FLAMM, R. K. Detection of mcr-1 among *Escherichia coli* clinical isolates collected worldwide as part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in 2014 and 2015. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 01267-16, July., 2016.

CHOWDHARY, A; SHARMA, C; MEIS, J. F. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl\_3, p. S436-S444, 2017.

CLSI-CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Publication M100-S23 Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, 2013.

CUPERTINO, V. M. L. Prevalência de genes de resistência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de animais de produção. Universidade federal do rio grande do sul, Campos do vale, 2016.

DONÀ, V; BERNASCONI, O. J; KASRAIAN, S; TINGUELY, R; ENDIMIANI, A. A SYBR® Green-based real-time PCR method for improved detection of mcr-1-mediated colistin resistance in human stool samples. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 9, p. 57-60, Jan., 2017.

EUCAST - European Committee on Antimicrobial susceptibility Testing Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. 2015

FERNANDES, M; SELLERA, F; ESPOSITO, F; SABINO, C; CERDEIRA, L; LINCOPAN, N. Colistin-resistant mcr-1-positive *Escherichia coli* on public beaches, an infectious threat emerging in recreational waters. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 7, p. e00234-17, Apr., 2017.

FERNANDES, R; AMADOR, P; PRUDÊNCIO, C.  $\beta$ -Lactamas: estrutura química, modo de ação e mecanismos de resistência. **Comentários em Medical Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 7-17, July., 2013.

FERREIRA, M. L; et al. Detection of ISEcp1-associated blaCTX-M-15-mediated resistance to colistin in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. **International journal of antimicrobial agents**, v. 51, n. 5, p. 810, Feb., 2018.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). **Journal Antimicrobial Chemother Oxford**, v.66, n.09, p. 2070-2074, Sep., 2011.

GIRARDELLO, R.; GALES, A. C. Resistência às polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. **Revista Epidemiologica Controle Infecções**, v.2, n.2, p.66-69. May., 2012.

HEDDINI, A.; CARS, O.; QIANG, S.; TOMSON, G. Antibiotic resistance in China - a major future challenge. **The Lancet Infectious Disease**, v. 373, n. 9657, p. 30, Jan., 2009.

HIGUITA-GUTIÉRREZ, L. F; QUICENO, J. N. J. Brotes hospitalarios de bacterias resistentes a colistina: revisión sistemática de la literatura. **Revista Infectio**, v. 21, n. 4, Dec., 2017.

KANG, M; MISCHER, R. A; BHAVE, S; KOMLA, E; CHO, A; HUANG, C; DEWEL, W. L; HAKBARALI, H. I. The effect of gut microbiome on tolerance to morphine mediated antinociception in mice. **Scientific reports**, v. 7, p. 42658, Feb., 2017.

JELOVCAN, S; LEEKITCHAROENPHON, P; WEISSENSTEINER, G; HENDRIKSEN, R. S; LASSNIG, H; ALLERBERGER, F; SPRINGER, B. Detection of plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1*) in *E. coli* isolated from pig caecum in Austria. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 53, p. 44, Dec., 2016.

LIU, Y.Y; WANG, Y; TIMOTHY, R; YI, L.X; ZHANG, R; SPENCER, J; DOI, Y; TIAN, G; DONG, B; HUANG, X; YU, L.F; GU, D; REN, H; CHEN, X; LV, L; HE, D; ZHOU, H; LIANG, Z. 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 Disease**, v. 16, n. 2, p. 161-168, Feb., 2016.

LUO, Q; YU, W; ZHOU, K; GUO, L; SHEN, P; LU, H; CHEN, H; XU, H; XIAO, Y; LI, L. Molecular epidemiology and colistin resistant mechanism of *mcr*-positive and *mcr*-negative clinical isolated *Escherichia coli*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2262, Nov., 2017.

MOFFATT, J. H; HARPER, M; HARRISSON, P; HALE, J. D. F; VINOGRADOV, E; SEEMANN, T; HENRY, R; CRANE, B; MICHAEL, F. S; COX, A; ADLER, B; NATION, R; LI, J; BOYCE, J. D.L. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 4971-4977, Dec., 2010.

NIJHUIS, R. H. T; VELDMAN, K. T; SCHELFOUT, J; ESSEN-ZANDBERGEN, A. V; WESSELS, E; CLAAS, E. C. J; GOOSKENS, J. Detection of the plasmid-mediated colistin-resistance gene *mcr-1* in clinical isolates and stool specimens obtained from hospitalized patients using a newly developed real-time PCR assay. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2344-2346, June., 2016.

NORDMANN, P.; JAYOL, A.; POIREL, L. Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 6, p. 1038, June., 2016.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 5, n. 5, p. 643, Nov., 2014.

OLIVEIRA, F. A.; ZACCARIOTTO, T. R.; PIVETA, C.; HOFLING, C. C.; RESENDE, M. R.; LEVY, C. E.; ESPOSITO, F.; FERNANDES, M. R.; CERDEIRA, L.; LINCOPAN, N. MCR-1-positive colistin-resistant *Escherichia coli* in immunocompromised hospitalised patients. **International journal of antimicrobial agents**, v. 52, n. 3, p. 438, June., 2018.

POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 2, p. 557-596, Mar., 2017.

RAMPELOTTO, R.F., et al. Resistance to colistin in blood culture isolates from newborns admitted to a school hospital. **Contact Us(Santa Maria)**, v. 43, p. 1-7. 2017.

ROSSI, F.; GIRARDELLO, R.; MORAIS, C.; CURY, A.; MARTINS, L.; SILVA, A.; ABDALLA, E.; SETUBAL, J.; DUARTE, A. Plasmid-mediated mcr-1 in carbapenem-susceptible *Escherichia coli* ST156 causing a blood infection: an unnoticeable spread of colistin resistance in Brazil? **Clinical microbiology**, v. 72, n. 10, p. 642-644, Oct., 2017.

SALY, M.; JAYOUL, A.; POIREL, L.; MEGRAUD, F.; NORDMAN, P.; DUBOIS, V. Prevalence of faecal carriage of colistin-resistant Gram-negative rods in a university hospital in western France, 2016. **Journal of medical microbiology**, v. 66, n. 6, p. 842-843, Apr., 2017.

SANTOS, S. O.; ROCCA, S. M. L.; HÖRNER, R. Colistin resistance in non-fermenting Gram-negative bacilli in a university hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 649-650, Dec., 2016.

TERVEER, E. M.; NIJHUIS, R. H. T.; CROBACH, M. J. T.; KNETSCH, C. W.; VELDKAMP, K. E. Prevalence of colistin resistance gene (mcr-1) containing Enterobacteriaceae in feces of patients attending a tertiary care hospital and detection of a mcr-1 containing, colistin susceptible *E. coli*. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0178598, June., 2017.

TORTORA, J. G.; FUNKE, R. B.; CASE, L.C. Microbiologia. 12. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2016.

ZAVASCKI, A. P.; GIRARDELLO, R.; MAGAGNIN, C. M.; ANTOCHEVIS, L. C.; MACIEL, R. A.; PALMEIRO, J. K.; GALES, ANA. C. Emergence of polymyxin B resistance in a polymyxin B-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* causing bloodstream infection in a neutropenic patient during polymyxin B therapy. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 90, n. 2, p. 134-138, Feb., 2018.