



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

DANIELY MARTINS DA SILVA

**Determinantes moleculares da resistência à
polimixina em cepas de *Klebsiella pneumoniae*
produtoras de carbapenemases isoladas no
Distrito Federal, Brasil**

Brasília, DF

2019

DANIELY MARTINS DA SILVA

**Determinantes moleculares da resistência à polimixina
em cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de
carbapenemases isoladas no Distrito Federal, Brasil**

Dissertação apresentada como
requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre do Programa de Pós-
graduação em Biologia Microbiana da
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Alex Leite Pereira

BRASÍLIA, DF

2019

DANIELY MARTINS DA SILVA

**Determinantes moleculares da resistência à polimixina
em cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de
carbapenemases isoladas no Distrito Federal, Brasil**

Orientador: Prof^o. Dr^o. Alex Leite Pereira
(FCE/Universidade de Brasília)

Banca Avaliadora

Prof^o. Dr^o Tatsuya Nagata – Presidente
(IB/Universidade de Brasília)

Prof^a. Dr^a. Cynthia Maria Kyaw – Membro Interno
(IB/Universidade de Brasília)

Prof^a. Dr^a Nádia Skorupa Parachin – Membro Externo
(IB/Universidade de Brasília)

Prof^a. Dr^a Thais Alves da Costa Lamounier - Suplente
(FCE/Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ter me dado forças nos momentos em que eu queria desistir e por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho.

À minha família. Meus pais, Maria e Carlos, por serem meu pilar, me darem todo o suporte necessário quando eu precisei e por sempre incentivarem meus estudos. Ao meu irmão Douglas, que sempre está ao meu lado.

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado nos dias difíceis e felizes. Thamires, obrigada por sempre estar comigo e partilhar a vivência do mestrado. Lauri, obrigada pela amizade de longa data e saber que sempre posso contar com você. Igor, Thais e Luísa, obrigada por me aguentarem desde a graduação e podermos compartilhar nossas experiências.

À Andressa, Guilherme, Anderson e Mickael, pelas noites de jogos e cookies.

À Marília e Bárbara, pelas guloseimas no horário do almoço e pelos cafés.

À Mayrla e a Lorena, por nunca desistirem de mim.

Ao meu namorado Mickael que entendeu a minha ausência em vários momentos e sempre me apoiou em cada decisão. Obrigada por todo amor, parceria e cuidado.

Aos alunos de pesquisa do professor Alex que me ajudaram diversas vezes. Thalison, Danielly, Pamela e Jéssica, eu não sei o que seria do meu mestrado se eu não pudesse contar com a parceria de vocês durante esse tempo. Muito obrigada!

À equipe da bacteriologia do LACEN-DF que me recebeu com muito carinho desde o início e que sempre esteve disposta a me ajudar e compartilhar seus conhecimentos. Em especial agradeço ao James, Lilian, Elly e Fernanda.

Ao Célio, pelos ensinamentos dados, pelos puxões de orelha quando necessário e por me encarregar de começar a pesquisa de resistência à polimixina no LACEN-DF.

Ao meu orientador Alex, por sempre compartilhar seus conhecimentos, acreditar em mim e por ser um excelente orientador. Agradeço também pela compreensão nos últimos meses.

RESUMO

Cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenem (KpRC) têm sido reportadas mundialmente limitando as opções de antibioticoterapia. Neste cenário, polimixinas figuram como drogas de último recurso para tratamento de infecções causadas por KpRC. Não obstante, isolados de KpRC resistentes à polimixina (KpRCP) têm emergido com a aquisição de genes *mcr* ou mutações em *mgrB* produzidas por sequências de inserção (IS). O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de susceptibilidade e mecanismos moleculares de resistência à polimixina em 152 cepas de *K. pneumoniae*, a maioria (95,4%) resistente a carbapenens, isoladas em hospitais de Brasília (Distrito Federal) no período de janeiro de 2014 a novembro de 2016. A concentração inibitória mínima (CIM) para polimixina B foi determinada por microdiluição. A presença de alelos de *mcr* (1 a 4) e a integridade do fragmento de amplificação de *mgrB* foram testadas em todas as cepas. Ensaio de sequenciamento genético foram realizados para identificar ISs que rompiam *mgrB* e definir tipos de sequências (STs) e complexos clonais (CC). O gene *mcr-1* foi detectado em quatro (4,3 %) dos isolados KpRCP (n = 94). Os genes *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* não foram detectados em nenhum isolado. Inserções no gene *mgrB* foram detectadas em 52 dos 94 isolados resistentes à polimixina com predomínio da sequência de inserção IS903 (30%) da família IS5. Entre as cepas de KpRCP predominaram os complexos clonais 258 (42%) e 2703 (25%). Foi detectada a emergência de cepas de KpRCP de ST2703 e genótipo *bla*_{NDM}⁺-*mgrB*::(+117)IS903. Conclui-se que inserções mutacionais em *mgrB* é o principal mecanismo de resistência à polimixina em isolados clínicos de KpRCP em Brasília.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*; multirresistência bacteriana; polimixina; *mgrB*; *mcr*.

ABSTRACT

Carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKp) strains have been reported worldwide limiting antibiotic therapy options. In this scenario, polymyxins appear as last-resort drugs for treating infections caused by CRKp. Nevertheless, polymyxin resistant CRKp isolates (CPRKp) have emerged along with the acquisition of *mcr* genes or disruption on *mgrB* produced by insertion sequences (IS). This study aimed to evaluate the susceptibility profile and molecular mechanisms supporting polymyxin resistance in 152 strains of *K. pneumoniae*, most (95.4%) resistant to carbapenems, isolated in hospitals in Brasília (Brazilian Federal District) during January 2014 to November 2016. The minimum inhibitory concentration (MIC) for polymyxin B was determined in microdilution assays. The presence of *mcr* alleles (1 to 4) and the integrity of *mgrB* amplicons gene were tested in all strains. Genetic sequencing assays were performed to identify ISs that disrupted *mgrB* and define sequence types (STs) and clonal complexes (CC). The *mcr-1* gene was detected in four (4.3%) of the CPRKp isolates (n = 94). The *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* genes were not detected. Insertions in the *mgrB* gene were detected in 52 out of 94 polymyxin resistant isolates with predominance of the IS903 insertion sequence (30%), an IS5 family member. Among CPRKp strains predominated the CC258 (42%) and CC2703 (25%). It was detected the emergence of PCRKp strains belonging to ST2703 with genotype $bla_{NDM}^+-mgrB:(+117)IS903$. We conclude that mutational insertions in *mgrB* is the main mechanism of resistance to polymyxin in clinical isolates of CRKp in Brasília.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; antimicrobial resistance; polymyxin; *mgrB*; *mcr*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular de polimixina E (A) e polimixina B (B)	21
Figura 2 - Esquema da regulação do sistema de dois componentes PhoPQ e PmrAB que modificam LPS em <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	24
Figura 3- Distribuição dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> por tipo de amostra clínica.	32
Figura 4 - Placa de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de polimixina corada com Resazurina.	35
Figura 5 - Foto do gel obtido através da eletroforese dos produtos de amplificação do gene <i>mgrB</i> .	37
Figura 6 - Classificação de IS por tipo de amostra	48
Figura 7 - Mapeamento de sítios de inserção mutacional em <i>mgrB</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de STs com respectivas variações em <i>locus</i> único (SLV) que compõem o CC258	18
Tabela 2 - Características associadas aos alelos de <i>mcr</i>	29
Tabela 3 – Lista de iniciadores utilizados e condições das reações de PCR	39
Tabela 4 – Características apresentadas por cepas de KpRC positivas para <i>mcr-1</i>	41
Tabela 5 – Integridade do <i>amplicon mgrB</i> em isolados de <i>K. pneumoniae</i> sensíveis e resistentes à polimixina	43
Tabela 6 – Identificação e percentual de ocorrência de sequências de inserção (ISs) identificadas rompendo <i>mgrB</i>	46
Tabela 7 – Caracterização dos isolados com rompimento do <i>mgrB</i> produzido por ISs	52
Tabela 8- Características associadas a STs e grupos clonais em cepas de KpRC sensíveis ou resistentes à polimixina (KpRCP)	53

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

BHI - Infusão cérebro e coração (do inglês, *Brain Heart Infusion*)

CC - Complexo clonal

CIM – Concentrao inibitória mínima

CMHCA - Caldo Mueller Hinton cátion ajustado

DAB - 2,4 cido diaminobutrico

dNTP - desoxinucleotídeos trifosfatos

ESBL - lactamases de espectro estendido

gapA - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HK - Histidina quinase

IMP - Imipenemase

InfB - Fator de inciao da tradução 2

IS - Elemento de inserção

ITU - infecções do trato urinário

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

KpRC - *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenem

KpRCP - *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenem e polimixina

L-Ara4N - 4-amino-4-deoxy-L-arabinose

LPS - Lipopolissacardeo

mdh - malato desidrogenase

MLST - Tipagem por sequenciamento de múltiplos *loci*

MβLs - metalo-β-lactamases

NDM - Nova Deli Metallo-B-Lactamase

PEtN - Fosfoetanolamina

pgi - Fosfoglicose isomerase

phoE - Fosforina E)

rpoB - sub-unidade beta da RNA polimerase B

RR - Proteína reguladora de resposta (RR

SLV - Variante de *locus* único

DLV - Variante de locus duplo

ST - Tipo de sequência

tonB - Transdutor de energia periplasmática

TSB - caldo soja tripticaseína

VIM - Verona imipenase (VIM)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
1.2 Fatores de virulência de <i>K. pneumoniae</i>	14
1.3 Fatores de resistência a antibióticos associados à <i>K. pneumoniae</i>	15
1.4 Carbapenemases detectadas em <i>K. pneumoniae</i>	16
1.5 Filogenia de <i>K. pneumoniae</i> e dispersão clonal de cepas portando <i>bla_{kpc}</i> ou <i>bla_{ndm}</i>	17
1.6 Polimixinas	20
1.7 Mecanismo de ação das polimixinas	21
1.8 Resistência bacteriana à polimixina	22
1.9 Resistência à polimixina mediada por plasmídeos - <i>mcr</i>	26
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Isolados bacterianos	32
4.2 Preservação, cultivo dos isolados bacterianos e extração de DNA	33
4.3 Ensaio de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima de polimixina B	33
4.3.1 Resazurina como indicador de crescimento bacteriano	34
4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> e <i>mcr-4</i>	35
4.5 Detecção e análise de integridade do <i>mgrB</i>	36
4.6 Sequenciamento de <i>mgrB</i>	37
4.7 Tipagem por sequenciamento de múltiplos <i>loci</i> (MLST)	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Frequência de cepas de <i>K. pneumoniae</i> resistentes à polimixina	41
5.2 Presença de genes de resistência <i>mcr</i> em isolados de <i>K. pneumoniae</i>	

resistente a carbapenem (KPRC)	41
5.3 Integridade do gene <i>mgrB</i> em isolados sensíveis e resistentes à polimixina	42
5.4 Identificação de ISs produzindo inserção mutacional em <i>mgrB</i>	44
5.5 Epidemiologia dos ISs associados mutação em <i>mgrB</i>	47
5.6 Mapeamento de sítios de inserção mutacional em <i>mgrB</i>	48
5.7 Tipos de sequência (ST) em isolados de KPRC sensíveis ou resistentes à polimixina (KPRCP)	50
6. CONCLUSÃO	55
7. PERSPECTIVAS	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é atualmente uma grave ameaça à saúde humana (LIU *et al.*, 2016). Infecções causadas por bactérias multirresistentes são associadas a altas taxas de mortalidade, ao aumento no tempo de permanência hospitalar e ao aumento de custos para o tratamento (KIDD *et al.*, 2017). Estima-se que em 2050 a cada 3 segundos uma pessoa morrerá por adquirir infecções por bactérias multirresistentes (REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2016).

Em virtude da panresistência apresentada frente aos betalactâmicos, a rápida dispersão das carbapenemases KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) e NDM (Nova Deli Metallo-B-Lactamase) tem elevado o nível de preocupação sobre resistência bacteriana em escala global (LIU *et al.*, 2016). Devido à emergência de bactérias Gram negativas produtoras de carbapenemase e ao escasso desenvolvimento de novos antibióticos, a polimixina tem sido frequentemente usada como último recurso de tratamento; principalmente em áreas com alta prevalência de isolados produtores de carbapenemase, como no Brasil (PEREIRA *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014; NATION *et al.*, 2014; JAYOL *et al.*, 2016).

Devido ao uso cada vez mais ampliado e às vezes inadequado, relatos sobre resistência à polimixina tornam-se cada vez mais frequentes. Em alguns lugares do mundo (Europa, China e América do Norte) a polimixina era utilizada em protocolos preventivos de redução de patógenos na microbiota intestinal e essa exposição foi relatada como responsável pela rápida emergência de resistência a esse antimicrobiano. Além disso, a polimixina E (colistina) foi utilizada comercialmente como promotor de crescimento animal, na profilaxia e tratamento de doenças em animais de corte, principalmente suínos e aves, inclusive no Brasil (NATION *et al.*, 2015; RHOUMA *et al.*, 2016).

1.1 *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae, da família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo Gram negativo, fermentador de lactose e caracterizado pela produção proeminente

de cápsula (LI *et al.*, 2014). Em humanos, a espécie compõe a microbiota nasal, orofaríngea, cutânea, intestinal e vaginal (POMAKOVA *et al.*, 2012; CALFEE, 2017). Adicionalmente *K. pneumoniae* comporta-se como um patógeno oportunista, causando infecções em pacientes imunocomprometidos ou com a ocorrência de comorbidades (LI *et al.*, 2014).

K. pneumoniae é também importante causa de infecções comunitárias, como pneumonia, infecções do trato urinário (ITU) e abscessos hepáticos (TZOUVELEKIS *et al.*, 2012; CALFEE, 2017). No começo dos anos 70, a espécie se estabeleceu em ambientes hospitalares e atualmente é uma das principais causas de infecções nosocomiais (TZOUVELEKIS *et al.*, 2012), predominando em casos de ITU e bacteremia (PACZOSA; MECSAS, 2016). Em um estudo feito no Brasil, *K. pneumoniae* figurou como principal agente etiológico de bacteremias primárias em adultos ocorridas de unidades de terapia intensiva (UTI), sendo isolada em 16,9% dos casos (ANVISA, 2015). A taxa de mortalidade em casos de bacteremia associados a *K. pneumoniae* pode atingir 37% (PACZOSA; MECSAS, 2016)

1.2 Fatores de virulência de *K. pneumoniae*

Dentre os principais fatores de virulência que repercutem na resistência de *K. pneumoniae*, se destacam a cápsula e o lipopolissacarídeo (LPS). A cápsula é uma matriz de polissacarídeos que reveste a célula bacteriana (PACZOSA; MECSAS, 2016). Sabe-se que em *K. pneumoniae* a produção intensificada da cápsula está correlacionada a uma maior virulência dos isolados e ao desenvolvimento de colônias hipermucoides (CAMPOS *et al.*, 2004; POMAKOVA *et al.*, 2012; CALFEE, 2017). As células com cápsulas proeminentes inibem a fagocitose mediada por células imunes, a opsonização e a lise mediada pelo sistema complemento; além de dificultar a ação de peptídeos antimicrobianos (POMAKOVA *et al.*, 2012; PACZOSA; MECSAS, 2016; CALFEE, 2017).

O LPS protege as bactérias contra as defesas humorais do hospedeiro e atua como forte ativador de resposta inflamatória. A porção mais externa do

LPS (antígeno O) é capaz de se ligar a fração C3b mantendo os demais efetores do sistema complemento a uma distância segura da membrana externa, impedindo então a ação efetiva do complexo de ataque à membrana (C5b-9). Em ação diferente, a porção lipídica do LPS (lipídeo A) liga-se a TLR4 (receptor do tipo Toll) e leva a produção de citocinas, ativando a resposta celular. Além disso, modificações estruturais no LPS protegem a bactéria contra peptídeos catiônicos antimicrobianos, como a polimixina (LI *et al.*, 2014; PACZOSA; MECSAS, 2016).

1.3 Fatores de resistência a antibióticos associados à *K. pneumoniae*

As infecções nosocomiais causadas por *K. pneumoniae* geralmente são mais prolongadas. Biofilmes formados por *K. pneumoniae* protegem as células bacterianas da resposta imune do hospedeiro e da ação de antibióticos. Além do mais, isolados de *K. pneumoniae* frequentemente apresentam fenótipos de múltipla resistência dada a aquisição de genes de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) ou de carbapenemases (TZOUVELEKIS *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2014; PACZOSA; MECSAS, 2016).

Durante as décadas de 1970 e 1980 era frequente o isolamento de *K. pneumoniae* portando plasmídeos com genes de resistência a aminoglicosídeos. Posteriormente começaram a emergir em *K. pneumoniae* plasmídeos com genes que codificavam ESBL, causando resistência a cefalosporinas e monobactam. Com a aquisição de resistência aos aminoglicosídeos, celalosporinas, monobactam, além de mutações cromossomais que conferiram resistência à fluoroquinolona, os carbapenens tornaram-se a última opção de tratamento para infecções multirresistentes causadas por *K. pneumoniae* na década de 1990. Esse cenário perdurou até a primeira década deste século, momento em que uma rápida disseminação de isolados produtores de carbapenemases ocorreu mundialmente (TZOUVELEKIS *et al.*, 2012). A produção de carbapenemases confere resistência a quase todos os β -lactâmicos, incluindo carbapenens (TZOUVELEKIS *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2014; PACZOSA; MECSAS, 2016). A emergência em escala global da resistência a carbapenens tornou limitada as

opções terapêuticas para as infecções multirresistentes por *K. pneumoniae*, e tem produzido uma demanda crescente do uso de polimixina como último recurso de tratamento disponível (AIRES *et al.*, 2016; BRAUN *et al.*, 2018).

1.4 Carbapenemases detectadas em *K. pneumoniae*

De acordo com a classificação de Ambler que se baseia na estrutura molecular das enzimas, as carbapenemases encontradas em *Enterobacteriaceae* pertencem às classes A, B e D de β -lactamases. Na classe A, a carbapenemase mais comum é KPC, é inibida por ácido clavulânico *in vitro*. Enzimas da classe B de metalo- β -lactamases (M β LS) são zinco dependentes e têm como os principais integrantes as carbapenemases Nova Deli Metalo-B-Lactamase (NDM), Verona imipenase (VIM), Imipenemase (IMP). Adicionalmente, as enzimas classe B são inibidas *in vitro* por EDTA. A classe D hidrolisa fracamente carbapenens e não são inibidas por EDTA ou ácido clavulânico. Um exemplo de carbapenemase da classe D é OXA-48 (TZOUVELEKIS *et al.*, 2012). Carbapenemases KPC, NDM, IMP, VIM e enzimas da classe D já foram detectadas em isolados de *K. pneumoniae* (PACZOSA; MECSAS, 2016).

O primeiro relato de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC ocorreu em 1996 no estado da Carolina do Norte, Estados Unidos (YIGIT *et al.*, 2001; MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013). Logo após, a ocorrência de isolados produtores de KPC passou a ser relatada nos cinco continentes (CHEN; ANDERSON; PATERSON, 2012; MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013). No Brasil, isolados de *K. pneumoniae* portando bla_{KPC} foram primeiramente reportados em 2009 (MONTEIRO *et al.*, 2009).

K. pneumoniae produtora de NDM foi isolada primeiramente em 2008, na Suécia, de um paciente que havia sido hospitalizado em Nova Deli, Índia (YONG *et al.*, 2009). Posteriormente, isolados produtores de NDM passaram a ser relatados em outros países do subcontinente indiano, que é considerado região endêmica para bactérias produtoras de NDM (WAILAN; PATERSON, 2014). No Brasil, o primeiro relato de *K. pneumoniae* portando bla_{NDM} foi em

2013 quando identificaram um isolado colonizando a região retal de um paciente no Rio de Janeiro em 2013 (PEREIRA *et al.*, 2014).

1.5 Filogenia de *K. pneumoniae* e dispersão clonal de cepas portando

*bla*_{KPC} ou *bla*_{NDM}

A tipagem por sequenciamento de múltiplos *loci* (do inglês, *multi-locus sequence typing*, MLST) é um método filogenético baseado na determinação do perfil alélico de genes vitais. Protocolos de MLST têm sido universalmente empregados para a identificação de linhagens de *K. pneumoniae* de dispersão global e potencial epidêmico (URWIN; MAIDEN, 2003; DIANCOURT *et al.*, 2005). Os genes analisados no MLST são genes que codificam proteínas relacionadas a processos metabólicos, e por serem essenciais são chamados de *housekeeping genes*. Tais genes estão sob uma seleção estabilizadora para a conservação da função metabólica e evoluem devagar, indicando a relação genética de forma mais confiável do que genes que estão sob seleção positiva. Para cada isolado bacteriano os alelos identificados para um conjunto de loci são combinados em um perfil alélico, sendo atribuída uma designação de tipo de sequência (do inglês, *sequence type* - ST). Os STs que são estreitamente relacionados são aglutinados em complexos clonais (CC) (URWIN; MAIDEN, 2003; PACZOSA; MECSAS, 2016). Vários STs foram detectados durante a disseminação mundial de *K. pneumoniae* portando *bla*_{KPC}, sendo a maioria pertencente ao ST258 (TZOUVELEKIS *et al.*, 2012; PACZOSA; MECSAS, 2016; SONNEVEND *et al.*, 2017). Clones de *K. pneumoniae* ST258 produtores de KPC são considerados um dos patógenos de melhor sucesso adaptativo em ambientes nosocomiais (TZOUVELEKIS *et al.*, 2012; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

No Brasil, isolados de *K. pneumoniae* ST258 portando *bla*_{KPC} já foram associados a um surto hospitalar em Ribeirão Preto, São Paulo (ANDRADE *et al.*, 2011). O ST258 compõe o CC258 que compreende 43 STs (CHEN *et al.*, 2014). Alguns destes STs como os variantes de *locus* único (SLV) ST11 (SLV em tonB), ST437 (SLV em tonB) e ST340 (SLV em tonB) são predominantes

no Brasil (Tabela 1) (ANDRADE *et al.*, 2011; SEKI *et al.*, 2011; NICOLETTI *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013; AIRES *et al.*, 2017 B). Em Brasília, os STs 11 e 340 predominam em cepas de *K. pneumoniae* portando *bla*_{KPC} (NICOLETTI *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013).

Tabela 1 - Lista de STs com respectivas variações em *locus* único (SLV) que compõem o CC258

ST	gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB	SLV
258	3	3	1	1	1	1	79	-
1879	1	3	1	1	1	1	79	gapA
1458	2	3	1	1	1	1	79	gapA
1461	18	3	1	1	1	1	79	gapA
379	44	3	1	1	1	1	79	gapA
512	54	3	1	1	1	1	79	gapA
554	57	3	1	1	1	1	79	gapA
1481	3	3	133	1	1	1	79	mdh
1850	3	3	1	80	1	1	79	pgi
3359	3	3	1	82	1	1	79	pgi
1406	3	3	1	1	13	1	79	phoE
1849	3	3	1	1	1	3	79	rpoB
1084	3	3	1	1	1	9	79	rpoB
744	3	3	1	1	1	45	79	rpoB
418	3	3	1	1	1	46	79	rpoB
1199	3	3	1	1	1	67	79	rpoB
859	3	3	1	1	1	1	1	tonB
864	3	3	1	1	1	1	2	tonB
11	3	3	1	1	1	1	4	tonB
2667	3	3	1	1	1	1	10	tonB
833	3	3	1	1	1	1	12	tonB
3365	3	3	1	1	1	1	14	tonB
1326	3	3	1	1	1	1	16	tonB
340	3	3	1	1	1	1	18	tonB
3237	3	3	1	1	1	1	19	tonB
757	3	3	1	1	1	1	22	tonB
270	3	3	1	1	1	1	23	tonB
855	3	3	1	1	1	1	26	tonB
2516	3	3	1	1	1	1	27	tonB
437	3	3	1	1	1	1	31	tonB
2296	3	3	1	1	1	1	38	tonB
1264	3	3	1	1	1	1	39	tonB
895	3	3	1	1	1	1	42	tonB

Continua

ST	gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB	SLV
2948	3	3	1	1	1	1	51	tonB
2208	3	3	1	1	1	1	59	tonB
1668	3	3	1	1	1	1	106	tonB
1680	3	3	1	1	1	1	111	tonB
2189	3	3	1	1	1	1	112	tonB
572	3	3	1	1	1	1	143	tonB
3332	3	3	1	1	1	1	264	tonB
2306	3	3	1	1	1	1	269	tonB
2040	3	3	1	1	1	1	326	tonB
3250	3	3	1	1	1	1	449	tonB

Legenda: ST: tipo de sequência. GapA: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. InfB: fator de iniciação da tradução 2. Mdh: malato desidrogenase. Pgi: Fosfoglicose isomerase. PhoE: Fosforina E. RpoB: sub-unidade beta da RNA polimerase B. TonB: Transdutor de energia periplasmática. SLV: variante de *locus* único.

Diferente do gene *bla*_{KPC} que teve sua dispersão mundial associada ao clone de *K. pneumoniae* ST258, a dispersão de *bla*_{NDM} não apresenta predomínio clonal (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; WAILAN; PATERSON, 2014). Três clones epidêmicos ST11, ST14, ST147 são frequentemente associados a isolados de *K. pneumoniae* produtores de NDM (VOULGARI *et al.*, 2014; WAILAN; PATERSON, 2014). E apesar de serem raros os relatos de ST258 em isolados que portam *bla*_{NDM}, é frequente a detecção de variantes de único *locus* do ST258 como o ST11, ST340 e ST542 (WAILAN; PATERSON, 2014). No Brasil, são escassos estudos sobre ST em isolados de *K. pneumoniae* produtores de NDM sendo o ST323 o único relatado até o momento (PEREIRA *et al.*, 2014).

Isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC e resistentes à polimixina têm sido reportados mundialmente. Ainda mais preocupante é a possibilidade de que isolados do ST258, que são endêmicos em ambientes hospitalares e associados à *bla*_{KPC}, passem a apresentar mecanismos de resistência à polimixina baseados em determinantes genéticos móveis (BOGDANOVICH *et al.*, 2011; MAVROIDI *et al.*, 2016).

1.6 Polimixinas

As polimixinas são polipeptídeos catiônicos antimicrobianos produzidos por diferentes subespécies de *Bacillus polymyxa* (MOYER; MILLS; YOW, 1953), reclassificado como *Paenibacillus polymyxa* (ASH *et al.*, 1993). As polimixinas já haviam sido introduzidas na prática clínica na década de 1960 para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram negativas e, a partir dos anos 70, foram descontinuadas devido à disponibilidade de outras classes de antimicrobianos menos tóxicos e mais eficazes (LI *et al.* 2005).

Atualmente, existem cinco tipos de polimixinas descritas e classificadas de A a E. Entretanto, somente duas são usadas para tratamento de infecções em humanos: a polimixina B e a polimixina E, também conhecida como colistina. As polimixinas são decapeptídeos compostos por um anel heptapeptídeo ligado a uma cadeia tripeptídica e um ácido graxo. O decapeptídeo é composto por várias unidades de 2,4 ácido diaminobutírico (DAB) que dão carga positiva à molécula. O aminoácido na posição 6 do decapeptídeo diferencia as polimixinas B e E. D-fenilalanina está presente na polimixina B, D-leucina está presente na colistina (FIGURA 1) (KOMURA; KURAHASHI, 1979; CAI; LEE; KWA, 2015).

As polimixinas são moléculas anfipáticas, uma vez que a estrutura tridimensional permite que a molécula tenha uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica. As unidades de DAB que são carregadas positivamente são responsáveis pela hidrofilia da porção peptídica da molécula, enquanto que a cauda de ácido graxo constitui a porção hidrofóbica. Essa característica permite que a molécula seja solúvel tanto em um ambiente aquoso bem como em ambiente não aquoso, como uma camada lipídica (HANCONK, 1997; EVANS; FEOLA; RAPP, 1999).

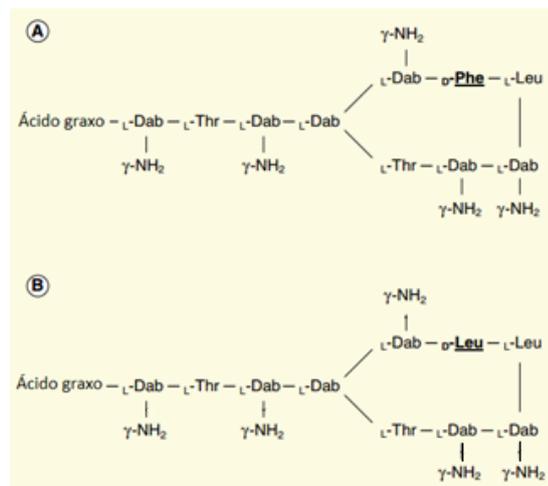


Figura 1 - Estrutura molecular de polimixina E (A) e polimixina B (B)

Fonte: Adaptado de CAI; LEE; KWA, 2015.

1.7 Mecanismo de ação das polimixinas

Os organismos alvo de ação das polimixinas são bacilos Gram negativos, como *Klebsiella sp.*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* (FALAGAS *et al.*, 2016). Entretanto algumas espécies de bacilos Gram negativos são intrinsicamente resistentes, dentre elas *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, *Morganella morganii*, *Burkholderia cepacia* complex, *Providencia spp.*, *Brucella spp.*, e *Edwardsiella spp.* (FALAGAS *et al.*, 2016; SRINIVAS; RIVARD, 2017). As polimixinas não possuem atividade contra bactérias anaeróbias ou Gram positivos (SRINIVAS; RIVARD, 2017).

A membrana externa presente em bactérias Gram negativas se assemelha à bicamada lipídica da membrana citoplasmática. Entretanto, além de possuir proteínas e fosfolipídios, também é composta por LPS, componente exclusivo da membrana externa e alvo da ação das polimixinas (VELKOV *et al.*, 2013; MADIGAN *et al.*, 2016). O LPS é composto pelo lipídeo A e a porção polissacarídica. O lipídeo A funciona como uma âncora hidrofóbica e é formado por ácidos graxos ligados a um dissacarídeo composto por glicosaminas fosfato. No lipídeo A atuam forças de van der Waals que ajudam na inserção do lipídeo na membrana externa; bem como, forças cátion divalente (Mg²⁺ e

Ca²⁺) que mantém as moléculas de LPS próximas umas das outras (VELKOV *et al.*, 2013; MADIGAN *et al.*, 2016).

Devido à carga positiva dos resíduos DAB, a polimixina tem uma alta afinidade pelo LPS. Quando a polimixina está próxima ao LPS, o anel heptapeptídeo policatiônico desloca os cátions Mg²⁺ e Ca²⁺ que apresentam afinidade de ligação a polimixina três vezes maior àquela apresentada pelo LPS (HANCOCK, 1997; EVANS; FEOLA; RAPP, 1999). Assim, a molécula de polimixina é capaz de inserir a cauda de ácido graxo (porção hidrofóbica) na membrana externa. A interação hidrofóbica da cauda de ácido graxo com o lipídeo A da membrana externa (EVANS; FEOLA; RAPP, 1999) causa ainda mais desestabilização à membrana e facilita a absorção de mais polimixinas (SRINIVAS; RIVARD, 2017). Este processo de desestabilização da membrana externa culmina com o extravasamento do conteúdo e morte celular (HANCOCK, 1997; FALAGAS *et al.*, 2006).

1.8 Resistência bacteriana à polimixina

Em bactérias, há vários mecanismos associados à resistência à polimixina, incluindo resistência cruzada entre polimixina B e E (CAI; LEE; KWA, 2015). A resistência a polimixina é geralmente ocasionada pela adição de 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) ou de fosfoetanolamina (PEtN) ao lipídeo A que resulta na alteração da carga líquida do LPS e uma diminuição na afinidade à polimixina. Fisiologicamente a adição de L-Ara4N e PEtn ocorre após a ativação do sistema PhoQ/PhoP e/ou PmrAB, em resposta a vários fatores ambientais como pH ácido, presença de peptídeos catiônicos antimicrobianos como a polimixina e concentração de alguns cátions (CANNATELLI *et al.*, 2013). Isolados da tribo *Proteeae*, do complexo *Burkholderia cepacia*, e das espécies *Serratia marcescens*, *Edwardsiella tarda* são intrinsecamente resistentes à polimixina por possuírem LPS modificado com L-Ara4N (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014). Para estes microrganismos, a concentração inibitória mínima de polimixina supera 200µg/mL, enquanto para as espécies sensíveis *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e

Enterobacter aerogenes o MIC é inferior a 2µg/mL (STORM; ROSENTHAL; SWANSON, 1977).

PhoPQ e PmrAB são exemplos de sistemas regulatórios bacterianos de dois componentes. O sistema é composto por uma proteína histidina quinase (HK) e uma proteína reguladora de resposta (RR). A proteína HK, ancorada à membrana citoplasmática, mantém um domínio sensor no periplasma da célula bacteriana e funciona como uma proteína sinalizadora. Quando há reconhecimento de um sinal pela proteína HK, alterações conformacionais resultam na autofosforilação de um resíduo de histidina. Em sequência, o grupo fosforil da proteína HK é transferido para um resíduo de aspartato na região N-terminal da proteína RR que se encontra no citoplasma. Quando fosforilada, a proteína RR funciona como um regulador transcricional, desencadeando a transcrição de vários genes dos sistemas PhoPQ e PmrAB envolvidos na modificação da estrutura do LPS (BEM *et al.*, 2015; GUNN, J. S., 2008; MONTAGNE *et al.*, 2001;). Nesses sistemas, PhoP e PmrA são os reguladores de resposta (RR) e PhoQ e PmrB são histidina quinases (HK). O sistema PmrAB é ativado pela presença de Fe³⁺ e Al³⁺ no meio ambiente; enquanto o sistema PhoPQ responde a baixas concentrações de Mg²⁺.

Em ambientes com baixas concentrações de Mg²⁺, como encontrado em vacúolos fagocíticos, o PhoQ é sensibilizado, levando à ativação por fosforilação do regulador PhoP. O PhoP fosforilado ativa vários genes que modelam a estrutura do LPS em espécies de bacilos Gram negativos; dentre eles, genes do operon *pmrHFIJKLM* (também conhecido como operon *pmrF*, *pbgP* ou *arn*) (NIKAIDO H., 2003; GUNN, J. S., 2008; POIREL *et al.*, 2015) (figura 2). Em *K. pneumoniae*, o operon *pmrH-M* pode ser ativado diretamente por PhoP que atua como ativador transcricional. Alternativamente, expressão de PmrD estabiliza PmrA fosforilado (sistema PmrAB) que ativará a transcrição de *pmrH-M* (Figura 2). O sistema PmrAB também ativa a transcrição do operon *pmrCAB* e do gene *pmrE* (figura 2) (MITROPHANOV *et al.*, 2008).

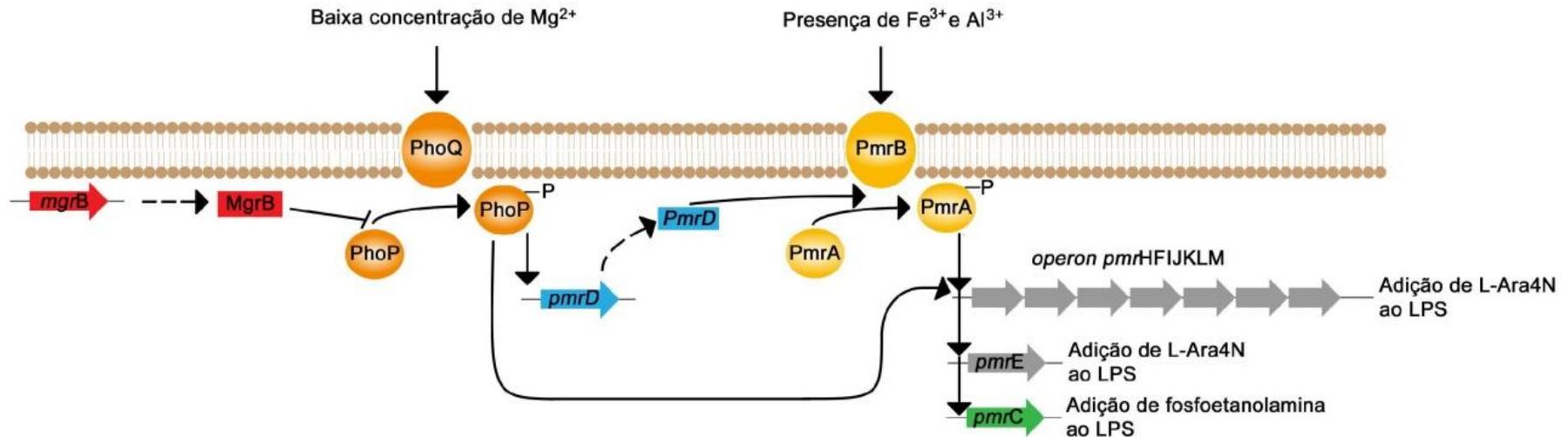


Figura 2 - Esquema da regulação do sistema de dois componentes PhoPQ e PmrAB que modificam LPS em *Klebsiella pneumoniae*. A ativação dos sistemas PhoPQ e PmrAB ocorre em baixa concentração de Mg²⁺ e na presença de Fe³⁺ e Al³⁺, respectivamente. PhoP ativa a transcrição do gene *pmrD* que estabiliza PmrA fosforilado. PmrA fosforilado inicia a transcrição do operon *pmrHFIJKLM* e do gene *pmrE*, que promovem modificação do LPS com adição de L-Ara4N; bem como do operon *pmrCAB* que promove adição de fosfoetanolamina ao LPS. O operon *pmrHFIJKLM* também pode ser ativado diretamente pelo ativador transcricional PhoP. O regulador negativo MgrB inibe o sistema PhoPQ evitando as modificações no LPS.

A expressão dos operons *pmrH-M* e *pmrCAB* culmina com modificações químicas do LPS que alteram sua carga elétrica líquida. Genes do operon *pmrH-M* codificam enzimas que adicionam L-Ara4N ao grupo 4-fosfato do lipídeo A, reduzindo a carga negativa de -1,5 para 0. A expressão de *pmrC* promove a adição de fosfoetanolamina (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014), no grupo 4-fosfato ou 1-fosfato do lipídeo A, reduzindo sua carga de -1,5 para 1 (NIKAIDO H., 2003). Devido à diminuição da carga negativa do LPS, a interação eletrostática do LPS com a polimixina, que possui carga positiva, fica prejudicada ou mesmo impossibilitada (TRIMBLE *et al.*, 2016).

Mutações nos sistemas PmrAB e PhoPQ podem ocasionar resistência à polimixina. Em cepas de *K. pneumoniae* foi observada que a troca do aminoácido treonina por prolina na posição 157 do PmrB leva a superexpressão dos operons *pmrCAB* e *pmrH-M* (JAYOL, 2014) e a substituição de leucina por arginina na posição 82 leva a um aumento na expressão de *pmrA* e *pmrK* (CANNATELLI *et al.*, 2014 A). Mutações nos genes *pmrA*, *phoP* e *phoQ* também são associadas à resistência à polimixina (OLAITAN *et al.*, 2014).

Além dos eventos de mutação, a susceptibilidade a polimixina pode ser alterada por estimulação do sistema PhoPQ. MgrB é uma proteína transmembrânica conhecida por atuar como reguladora negativa da expressão do sistema PhoPQ em *E. coli*, *Salmonella enterica* e outras enterobactérias. Em 2013, Cannatelli e colaboradores observaram que inserções no gene *mgrB* levam a superexpressão do sistema PhoPQ e por consequência, a ativação do operon *pmrH-M*. Os autores detectaram esse mecanismo de resistência à polimixina após compararem dois isolados *K. pneumoniae* produtores de KPC recuperados de hemocultura de um paciente. O primeiro isolado era sensível a polimixina E e o segundo, isolado 30 dias depois, era resistente à polimixina E. Durante esse período o paciente recebera vários antimicrobianos, incluindo tigeciclina, gentamicina, meropenem e polimixina E, sendo o último antimicrobiano administrado por 25 dias na forma de aerossol e 14 dias na forma intravenosa. A única diferença entre os isolados era a presença de uma

sequência de inserção do tipo IS5 que rompia o gene *mgrB* detectada no isolado resistente à polimixina. Para confirmar se a resistência à polimixina era causada pela inserção, os autores reintroduziram o gene *mgrB* funcional no isolado resistente e isso levou a redução da CIM de polimixina para o mesmo nível do isolado sensível. Também foi inativado o gene *mgrB* do isolado sensível, aumentando a CIM de polimixina para o mesmo nível do isolado resistente (CANNATELLI *et al.*, 2013). Posteriormente Cannatelli e colaboradores realizaram um estudo com um número maior de isolados e observaram que a resistência a polimixina também estava relacionada a pequenas e grandes deleções do locus *mgrB*, bem como mutações pontuais que resultam em substituições de aminoácidos em MgrB e terminação prematura da transcrição de *mgrB* (CANNATELLI *et al.*, 2014 b).

1.9 Resistência à polimixina mediada por plasmídeos - *mcr*

Até novembro de 2015, quando ocorreu a descoberta de plasmídios portando genes *mcr-1* (do inglês, *mobilized colistin resistance*), relatos de resistência à polimixina em *K. pneumoniae* eram amplamente sustentados por determinantes genéticos cromossomais que envolviam a modulação dos sistemas *pmrAB* e *phoPQ* e modulação negativa do *mgrB* (LIU *et al.*, 2016). Genes *mcr* codificam uma fosfoetanolamina transferase que catalisa a adição de fosfoetanolamina ao lipídeo A, fazendo com que diminua a afinidade da polimixina ao LPS.

Até o momento são conhecidos oito alelos de *mcr* (ABUOUN *et al.*, 2018; BOROWIAK *et al.*, 2017; CARATOLI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2016; XAVIER *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018; YIN., *et al.*, 2017). Entretanto é rara a presença de genes *mcr* em isolados de *K. pneumoniae*, provavelmente por afetar negativamente o *fitness* bacteriano (TIETGEN *et al.*, 2018). Os escassos relatos de *mcr* em *K. pneumoniae* estão restritos à ocorrência de *mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-7* e *mcr-8* (Tabela 2) (AIRES *et al.*, 2017 A; YIN *et al.*, 2017; DALMOLIN *et al.*, 2018; HIGASHINO *et al.*, 2018; XIANG *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018;).

A descoberta do gene *mcr-1* ocorreu na China durante um projeto de vigilância de resistência em isolados *Escherichia coli* recuperados de animais de corte. Pesquisadores verificaram um rápido aumento na resistência à polimixina E e desconfiaram da existência de algum mecanismo plasmidial de resistência, já que mutações cromossômicas que determinam resistência à polimixina são difíceis de acontecer em *Escherichia coli*. O sequenciamento genético do plasmídeo pHNSHP45 levou a descoberta de uma fase de leitura aberta de 1.626pb codificando uma fosfoetanolamina transferase que foi nomeada MCR-1. A transferase MCR-1 exibe 63% de identidade com a fosfoetanolamina transferase (EptA) de *Paenibacillus sophorae* (LIU *et al.*, 2016). A descoberta ganhou imediata notoriedade mundial em virtude de a polimixina ser antibiótico de último recurso para infecções causadas por bactérias multirresistentes; e por ter descrito pela primeira vez um elemento genético móvel responsável pela disseminação da resistência à polimixina em isolados bacterianos de animais e humanos.

Poucos meses depois, a existência de *mcr-1* foi reportada nos cinco continentes, detectado em bactérias isoladas de águas de rio, animais de corte, pacientes infectados e pessoas assintomáticas (BARON *et al.*, 2016; SKOV; MONNET, 2016). Vários gêneros já foram identificados portando *mcr-1*, como *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* e *Enterobacter* (BARON *et al.*, 2016) com predominância em *Escherichia coli* (SKOV; MONNET, 2016). Apesar de ter sido descoberto recentemente, um estudo detectou *mcr-1* em isolados dos anos 80 que foram recuperados de frango, justamente no período em que começou o uso da polimixina E em animais na China (SHEN *et al.*, 2016).

Em 2016 foi identificado o gene *mcr-2* no plasmídeo IncX4. O gene *mcr-2* tem 76,75% de identidade nucleotídica com o *mcr-1* e 64% de identidade proteica com a fosfoetanolamina transferase de *Moraxella osloensis* (XAVIER *et al.*, 2016). Evolutivamente, *mcr-2* se encontra no mesmo subclado que *mcr-1* e o gene de fosfoetanolamina transferase de *Paenibacillus sophorae* (SUN *et al.*, 2017).

O *mcr-3* identificado em 2017 mostrou 45,0% de identidade com a sequência nucleotídica de *mcr-1* e 47,0%, de *mcr-2*; entretanto, sua similaridade com genes de fosfoetanolamina transferase de enterobactérias é muito maior quando comparada com *mcr-1* e *mcr-2*. O MCR-3 apresenta identidade de 99.8% a 100% com a sequência de aminoácidos de fosfoetanolamina transferase de *E. coli* isolada de porco na Malásia, de isolado clínico de *K. pneumoniae* da Tailândia e de isolados clínicos de *S. enterica* serovar Typhimurium recuperados nos Estados Unidos (YIN., *et al.*, 2017).

O gene *mcr-4* foi inicialmente identificado em uma cepa de *Salmonella enterica* isolada de um porco na Itália em 2013 e posteriormente foi encontrado em cepas de *E. coli* isoladas de porcos na Espanha e Bélgica entre os anos de 2015 e 2016. MCR-4 apresenta 82% a 99% de identidade com a sequência de aminoácidos de fosfoetanolamina transferases de espécies de *Shewanella* e 34%, 35% e 49% de identidade com a sequência de aminoácidos de MCR-1, MCR-2, MCR-3, respectivamente (CARATTOLI *et al.*, 2017).

Tabela 2 - Características associadas aos alelos de *mcr*

Alelo	Identidade de aminoácidos	Primeiro relato	Espécies	Referência
<i>mcr-1</i>	63% de identidade fosfoetanoamna transferase (EptA) de <i>Paenibacillus sophorae</i> (WP_036596266.1)	Novembro, 2016	<i>Moraxella porci</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>Enterobacter spp.</i> ; <i>Raoultella ornithinolytica</i> ; <i>Citrobacter braakii</i> ; <i>Shigella spp.</i> ; <i>Cronobacter sakazakii</i> ; <i>Kluyvera ascorbata</i> .	LIU <i>et al.</i> , 2016; ABUOUN <i>et al.</i> , 2018; WANG <i>et al.</i> , 2017; LUO <i>et al.</i> , 2017; SENNATI <i>et al.</i> , 2017; HADJADJ <i>et al.</i> , 2017.
<i>mcr-2</i>	81% identidade <i>mcr-1</i>	Julho, 2016	<i>E. coli</i> ; <i>Salmonella spp.</i>	XAVIER <i>et al.</i> , 2016; GARCIA-GRAELLS <i>et al.</i> , 2018.
<i>mcr-3</i>	35% identidade <i>mcr-1</i>	Junho, 2017	<i>E. coli</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>Aeromonas spp.</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ; <i>Shigella, spp.</i>	YIN <i>et al.</i> , 2017; PARTRIDGE <i>et al.</i> , 2018; SHEN <i>et al.</i> , 2018; XIANG <i>et al.</i> , 2018; WANG <i>et al.</i> , 2018.
<i>mcr-4</i>	34% identidade <i>mcr-1</i>	Agosto, 2017	<i>Salmonella Typhimurium</i> ; <i>E.coli</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i> .	CARATOLI <i>et al.</i> , 2017; CHAVDA <i>et al.</i> , 2018.
<i>mcr-5</i>	38,64% identidade <i>mcr-1</i>	Dezembro, 2017	<i>Salmonella sp</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Aeromonas hydrophila</i> ; <i>E. coli</i> .	BOROWIAK <i>et al.</i> , 2017; SNESRUD <i>et al.</i> , 2018; MA <i>et al.</i> , 2018; HAMMERL <i>et al.</i> , 2018
<i>mcr-6</i>	82,81% identidade <i>mcr-1</i>	Outubro, 2018	<i>Moraxella pluranimalium</i> .	ABUOUN <i>et al.</i> , 2018
<i>mcr-7</i>	35% identidade <i>mcr-1</i>	Abril, 2018	<i>K. pneumoniae</i> .	YANG <i>et al.</i> , 2018
<i>mcr-8</i>	31% identidade <i>mcr-1</i>	Julho, 2018	<i>K. pneumoniae</i> ; <i>R. ornithinolytica</i>	WANG <i>et al.</i> , 2018; WANG <i>et al.</i> , 2019

2. JUSTIFICATIVA

As taxas de resistência à polimixina ainda são baixas, mas há uma preocupação com a mudança desse cenário (NATION *et al.*, 2014) já que polimixinas são utilizadas muitas vezes como último recurso terapêutico para infecções causadas por bactérias multirresistentes. O aumento na frequência de cepas resistentes à polimixina e a disseminação dos determinantes genéticos da resistência é preocupante, pois poderá elevar o nível de resistência a patamares que podem impossibilitar o tratamento efetivo. Em São Paulo, a taxa de resistência à polimixina em KpRC saiu de 0% em 2009 para 30,6% em 2015 (BRAUN *et al.*, 2018). Dado este cenário, o presente estudo visa caracterizar determinantes da resistência à polimixina em isolados clínicos de KpRC recuperados em hospitais públicos e privados de Brasília, Distrito Federal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a susceptibilidade à polimixina e mecanismos de resistência associados em cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenems (KpRC) isoladas em hospitais de Brasília-DF e reportadas ao LACEN-DF.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência de resistência à polimixina;
- Descrever a frequência de genes *mcr* ;
- Identificar alelos de *mcr* por sequenciamento genético;
- Realizar sequenciamento do gene *mgrB* avaliando sua integridade
- Identificar elementos de inserção (IS) que rompam o gene *mgrB*;
- Mapear pontos de inserção de ISs na sequência de *mgrB*;
- Definir o tipo de sequência (ST) das cepas de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina;
- Identificar e caracterizar linhagem clonais envolvidas na emergência de resistência à polimixina

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados bacterianos

Foram analisadas 152 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, a maioria (95,4% - 145 cepas) resistente aos carbapenems, isoladas em hospitais públicos e privados que foram enviadas ao Laboratório de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF) no período de janeiro de 2014 a novembro de 2016 para confirmação de diagnóstico ou vigilância epidemiológica. Das cepas incluídas no estudo, 54% (82/152) eram positivas para bla_{KPC} , 39% (60/152) positivas para bla_{NDM} , 2% (3/152) positivas para bla_{KPC} e bla_{NDM} . Dois por cento das cepas (3/152) eram negativas para bla_{KPC} ou bla_{NDM} e em 3% (4/152) das cepas não foi realizada a caracterização molecular de carbapenemase. As cepas foram isoladas de swab retal (32,89%), hemocultura (21,71%), urina (15,13%), trato respiratório (14,47%) (lavado brônquico, aspirado endotraqueal), pontas de cateter (3,95%) e outros sítios de infecção, como escara e fragmento de tecido (Figura 3).

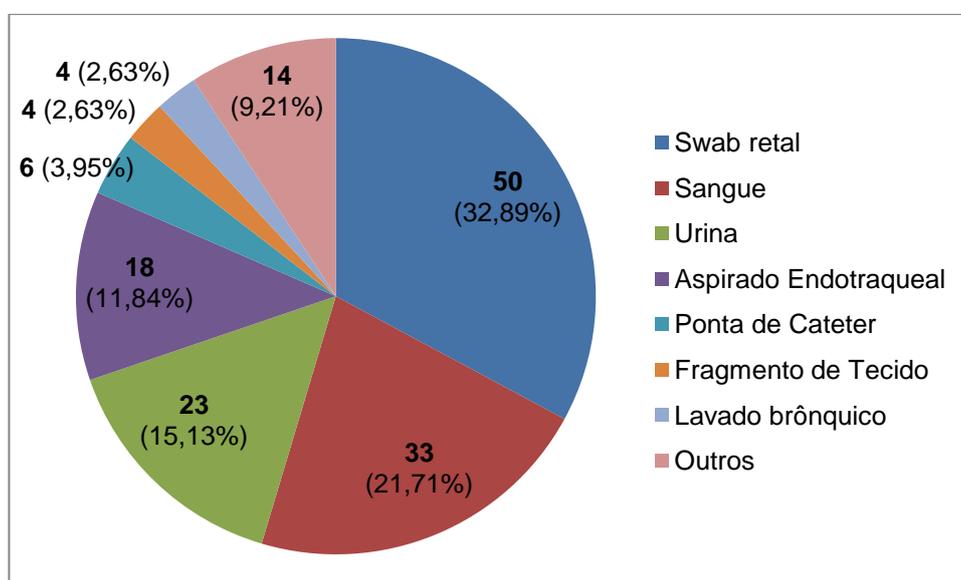


Figura 3- Distribuição dos isolados de *K. pneumoniae* por tipo de amostra clínica. O grupo "outros" é composto por amostras de escara, líquido peritoneal, secreção, abscesso abdominal, fragmento de amputação, sítio cirúrgico, swab de vigilância.

A identidade dos isolados foi retestada no sistema MicroScan Walkaway (Beckman Coulter) que identifica o microrganismo por meio de testes bioquímicos e determina o perfil de susceptibilidade antimicrobiana pela concentração inibitória mínima (CIM) utilizando uma leitura fluorométrica, colorimétrica ou turbidimétrica. A identidade da espécie ainda foi confirmada por espectrometria de massa (VITEK® MS - bioMérieux). Adotou-se como critério de inclusão a confirmação positiva da espécie *Klebsiella pneumoniae* por espectrometria de massa (VITEK® MS – bioMérieux) e utilizou-se o manual BrCast 2018 para definir pontos de corte de CIM de polimixina E, amicacina, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, azitromicina, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacino, cefepime, cefuroxime, ertapenem, fosfomicina, gentamicina, imipenem, levofloxacino, meropenem, nitrofurantoína, norfloxacino, piperacilina-tazobactam, trimetropim-sulfametaxazol, tigeciclina, tobramicina (BrCAST, 2018).

4.2 Preservação, cultivo dos isolados bacterianos e extração de DNA

Os isolados bacterianos foram preservados em caldo BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*) (suplementado com 15% de glicerol) para criopreservação armazenados em freezer a -70° ($\pm 2^{\circ}\text{C}$). Vinte microlitros do caldo BHI de criopreservação foram utilizados para recuperação dos isolados a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24 horas em caldo soja tripticaseína (TSB). Os isolados que foram selecionados como resistentes à polimixina (CIM $> 2\mu\text{g/mL}$ definido no sistema automatizado MicroScan Walkaway (Beckman Coulter) foram submetidos a crescimento com adição de $2\mu\text{g/mL}$ de polimixina em caldo TSB por aproximadamente 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$. As culturas seguiram para a extração de DNA utilizando o kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega Corporation) de acordo com as instruções do fabricante.

4.3 Ensaio de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima de polimixina B

As cepas de *K. pneumoniae* foram semeadas por esgotamento em ágar Mueller Hinton para obter colônias isoladas. As placas de cultura foram

incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ por aproximadamente 18 horas. Posteriormente foram selecionadas colônias lisas para obtenção de uma suspensão bacteriana em solução salina 0,85% com turbidez ajustada para o nível 0,5 da escala de McFarland. Uma solução aquosa estoque de polimixina B (Sigma - P4932) foi preparada na concentração de 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir dessa solução estoque, uma solução de trabalho de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de polimixina foi preparada em Caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (CMHCA). Placas para microcultivo com 96 poços foram preparadas para a microdiluição colocando 50 μL de CMHCA em cada poço, excetuando a coluna 12. Posteriormente foram dispensados 100 μL /poço da solução de trabalho de polimixina B (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na coluna 12. Para início do procedimento de microdiluição, uma alíquota de 50 μL /poço foi retirada da coluna 12 e dispensada na coluna 11 e homogeneizada. Os passos de microdiluição seguiram como descrito até a coluna 3, que por fim teve uma alíquota de 50 μL /poço recolhida e descartada. Suspensões bacterianas (ajustadas para em 0,5 da escala MacFarland) foram diluídas 1/100 e 50 μL /poço foram usados como inóculo da coluna 2 até a coluna 12. Desse modo a coluna 1 comportou o controle de esterilidade do meio CMHCA; a coluna 2, o controle de crescimento bacteriano; e as colunas 3 a 12 comportaram a microdiluição de polimixina variando a concentração testada de 0,125 a 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As placas de microdiluição foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 18 horas. A inibição do crescimento bacteriano foi detectada pela adição de 30 μL /poço de solução de trabalho de resazurina e incubação das placas de microcultivo por 2 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$. Em todas as análises foram utilizadas as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como controle de susceptibilidade a polimixina (Figura 4).

4.3.1 Resazurina como indicador de crescimento bacteriano

Uma solução estoque 100X foi preparada dissolvendo 0,05 gramas de sal de resazurina (Sigma) em 10 mL de água ultrapura. Para a solução de trabalho foi feita uma diluição de 1:100 da solução estoque em água ultrapura. A resazurina é um corante indicador fracamente fluorescente de cor azul que, através do metabolismo ativo de células viáveis sofre uma redução química

irreversível em resofurina de coloração rosa. Há uma correlação direta entre a redução da resazurina com a quantidade de organismos vivos, aplicada desde células bacterianas até células de mamíferos (O'BRIEN *et al.*, 2000; CZEKANSKA, 2011; RISS *et al.*, 2013).

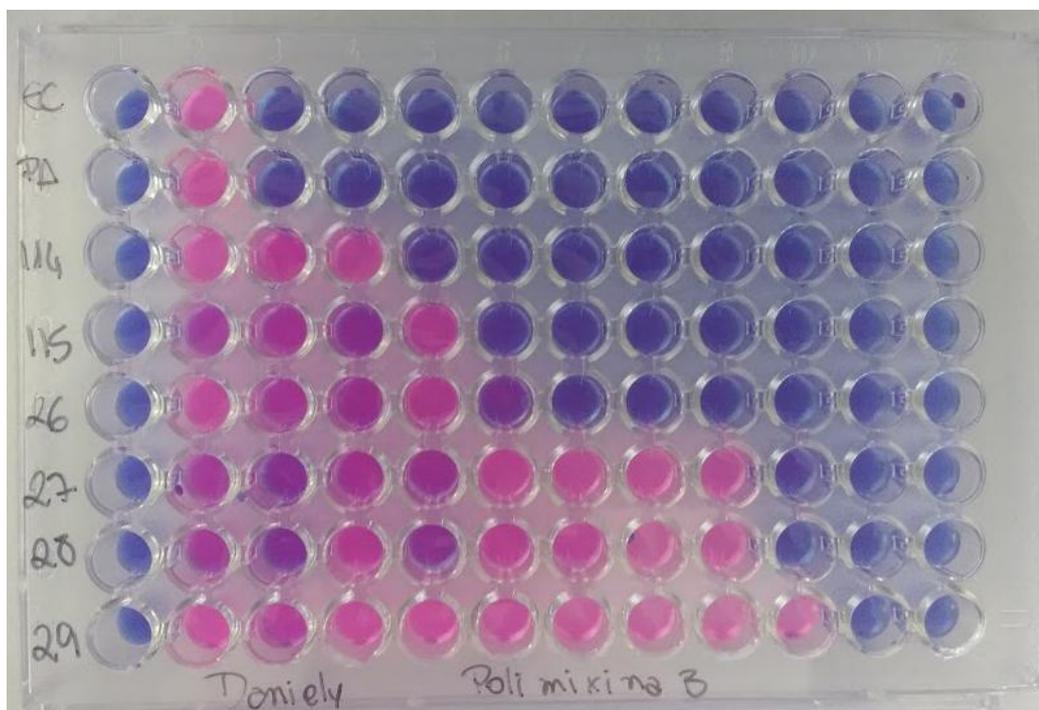


Figura 4 - Placa de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de polimixina corada com Resazurina. EC: *Escherichia coli* ATCC 25922, PA: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* e *mcr-4*

Neste trabalho foi triada a presença de *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* e *mcr-4*, por serem os alelos conhecidos a época da caracterização molecular (novembro de 2017). A mistura de reação continha 0,5 μ M de cada iniciador, 0,2 mM de desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP), 1,5 mM cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e 0,03 U/ μ l de Taq DNA polimerase em tampão de reação 1X e aproximadamente 200 pg/ μ L de DNA. As condições para amplificação foram desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de amplificação (programação: 94°C por 30s; Tm de iniciadores por 30s; e 72°C por 60s) e extensão final por 2 minutos a 72°C. Os iniciadores utilizados e respectivos Tm

estão dispostos na tabela 3. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 2%, preparado em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA). Após eletroforese, o gel foi corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) e transiluminado por luz ultravioleta para visualização dos fragmentos amplificados. A cepa de *Escherichia coli* cedida pelo LACEN-PR foi utilizada como controle positivo para amplificação de *mcr-1*.

4.5 Detecção e análise de integridade do *mgrB*

A presença e integridade de *mgrB* foi testada por PCR em todos os isolados. A mistura de reação continha 0,5 µM de cada iniciador, 0,2 mM de desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP), 1,5 mM cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,03 U/µl de Taq DNA polimerase em tampão de reação 1X e aproximadamente 200 pg/µL de DNA. As condições térmicas para amplificação seguiram desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C; 35 ciclos de amplificação (programação: 94°C por 30s; 54°C por 30s; e 72°C por 60s) e passo de extensão final por 2 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 2% como supracitado. Para os isolados que não tiveram *mgrB* amplificado, nova extração de DNA foi realizada e nova reação de PCR foi realizada com iniciadores EE_*mgrB* para a confirmação da deleção do gene. Os produtos de amplificação de *mgrB* apresentando tamanho usual (250pb) ou atípico foram submetidos sequenciamento de DNA (Figura 5).

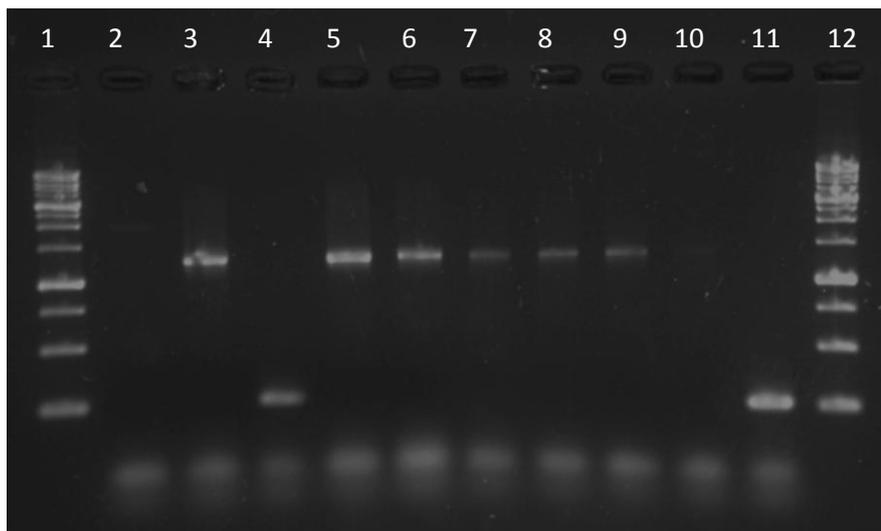


Figura 5 - Foto do gel obtido da eletroforese dos produtos de amplificação do gene *mgrB*. Na canaleta 1 e 12 contém o padrão de massa molecular 1Kb (Kasvi). Nas demais canaletas observam os demais produtos após amplificação por PCR do gene *mgrB*, tendo exemplo do gene íntegro nas canaletas 4 e 11.

4.6 Sequenciamento de *mgrB*

Para o sequenciamento foram preparadas reações de sequenciamento (BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1) utilizando os iniciadores MGRB-F e MGRB-R (Tabela 3). Reações de sequenciamento foram purificadas com o sistema de purificação BigDye XTerminator e, posteriormente, analisadas no analisador genético 3500 Genetic Analyzers (Applied Biosystems®). As seqüências consenso obtidas do *mgrB* íntegro foram comparadas com as seqüências disponíveis no banco de dados GenBank utilizando o programa para alinhamento de seqüências BLAST. Seqüências consenso de *mgrB* de tamanho atípico foram analisadas com o programa ISfinder (<http://www-is.biotoul.fr>) para a identificação de seqüências de inserção (ISs) e mapeamento das regiões repetidas (IRR e IRL). O mapeamento dos sítios de inserção em *mgrB* foi baseada na seqüência nucleotídica da seqüência codante de *mgrB* íntegro de *K. pneumoniae* depositada no GenBank sob o nº MH337365.1 e a seqüência CP031562.1 (1902212..1902476), que possui a região promotora do *mgrB*. As seqüências de DNA foram editadas usando o programa Bioedit e o mapeamento físico de inserções foi elaborado usando o

programa *DNA* *Sequence* *Editor* (WebDSV)
<http://www.molbiotools.com/WebDSV/index.html>). Para o mapeamento dos transposases foram utilizadas as seguintes sequências nucleotídicas depositadas no GenBank sob os números J01728.1 (IS102), MF344562.1 (IS10L), X00011.1 (IS28), MG214777.1 (IS903), CP006663.1 (IS903B), NZ_UJVX01000018.1 (17783..18870) (ISAs22), AJ242809.1 (187..1449) (ISEcp1), EU780013.1 (28382..29314) (ISKpn13), NC_016845.1 (3578574..3579554) (ISKpn26), MH337366.1 (ISSen4).

4.7 Tipagem por sequenciamento de múltiplos *loci* (MLST)

O MLST foi realizado segundo protocolo definido por Diancourt e colaboradores (DIANCOURT *et al.*, 2005) com pequenas modificações. Foram analisados 7 *loci* para definir o perfil alélico e o ST: *rpoB* (sub-unidade beta da RNA polimerase B), *gapA* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *mdh* (malato desidrogenase), *pgi* (fosfoglicose isomerase), *phoE* (fosforina E), *infB* (fator de iniciação da tradução 2), *tonB* (transdutor de energia periplasmática). As condições térmicas para amplificação seguiram desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C; 35 ciclos de amplificação (programação: 94°C por 30s; 55°C por 60s; e 72°C por 30s) e passo de extensão final por 2 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 2% e purificados. As reações de sequenciamento (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing) foram feitas com o iniciador F universal (Tabela 3). Os produtos das reações foram analisados no sequenciador 3500 Genetic Analyzers. As sequências geradas foram editadas no programa BioEdit (Sequence Alignment Editor e comparadas com o banco de dados do Instituto Pasteur para determinação do ST (<https://bigsd.bpasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>).

Tabela 3 - Lista de iniciadores utilizados e condições das reações de PCR

Gene	Descrição do Locus	Alvo GenBank	Fragmento esperado (pb)	Iniciadores (5'-3')	Temperatura de anelamento (Tm)	Referência
<i>clr-5</i>	Fosfoetanolamina transferase (mcr-1)	MH733010.1 (82001..82309)	309	F - CGGTCAGTCCGTTTGTTCC R - CTTGGTCGGTCTGTAGGG	56°C	LIU <i>et al.</i> , 2016
<i>mcr-2</i>	Fosfoetanolamina transferase (mcr-2)	NG_051171.1 (641..977)	337	F - TTTCCGGGTGCATAAGCCAGT R - AGCTGAACATACACGGCACA	56°C	Iniciadores desenhados nesse estudo
<i>mcr-3</i>	Fosfoetanolamina transferase (mcr-3)	NG_060583.1 (146..687)	542	F - TTGGCACTGTATTTTTGCATTT R - TTAACGAAATTGGCTGGAACA	50°C	YIN <i>et al.</i> , 2017
<i>mcr-4</i>	Fosfoetanolamina transferase (mcr-4)	NG_057471.1 (490..977)	488	F - ATTGGGATAGTCGCCTTTTT R - TTACAGCCAGAATCATTATCA	38°C	CARATTOLI <i>et al.</i> , 2017
<i>mgrB</i>	MgrB	CP003200.1 (3337097..3337349)	253	F - AAGGCGTTTCATTCTACCACC R - TTAAGAAGGCCGTGCTATCC	54°C	CANNATELLI <i>et al.</i> , 2013
<i>EE_mgrB</i>	MgrB	CP003200.1 (3,336,459..3,337,965)	1507	F - GGCTATGGCGAGGATAATGAG R - GCTGTGATGTAAGCGTCTGGTG F - GTTTTCCAGTCACGACGTTGTA CCGCTGTCTGAGATTACGC R - TTGTGAGCGGATAACAATTC AGAACGGGTGTA CTTGGTCA F - GTTTTCCAGTCACGACGTTGTA GACGGTCATCTGGTCGTTAAC R - TTGTGAGCGGATAACAATTC TCGTAGGACGCTGCTTTTTTC F - GTTTTCCAGTCACGACGTTGTA CTCGTTGTACGACATCGCTC R - TTGTGAGCGGATAACAATTC AGAAGAAACGCGCATAGTGG F - GTTTTCCAGTCACGACGTTGTA AACTTCTTCGGTGCGGAAAC R - TTGTGAGCGGATAACAATTC CTGTGCTGGCTGCTAACTTC	54°C	CANNATELLI <i>et al.</i> , 2014
<i>rpoB</i>	Sub-unidade beta da RNA polimerase B	CP031817.1 (4,881,629..4,882,348)	720			
<i>gapA</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	CP031817.1 (3,030,465..3,031,042)	578		55°C	Iniciadores desenhados nesse estudo
<i>mdh</i>	Malato desidrogenase	CP031817.1 (495,522..496,225)	704			
<i>pgi</i>	Fosfoglicose isomerase	CP031817.1 (4,822,151..4,822,779)	629			

Continua

Gene	Descrição do Locus	Alvo GenBank	Fragmento esperado (pb)	Iniciadores (5'-3')	Temperatura de anelamento (Tm)	Referência
<i>phoE</i>	Fosforina E	CP031817.1 (4,007,021..4,007,507)	487	F – GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA CCGTGAAGCGAAGAAACAGAA R – TTGTGAGCGGATAACAATTC GTCATCGTTGATGCCGAGTTT	55°C	Iniciadores desenhados nesse estudo
<i>infB</i>	Fator de iniciação da tradução 2	CP031817.1 (561,744..562,150)	407	F – GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA GGGTGGTATTACCCAGCACA R – TTGTGAGCGGATAACAATTC GCTCAAGAACTTCAGCCTGC		
<i>tonB</i>	Transdutor de energia periplasmática	CP031817.1 (2,061,444..2,061,916)	473	F – GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA GACGCAGCCGATAGAGATCA R – TTGTGAGCGGATAACAATTC GCAGATTATCAATGCGGCCA		

F: Forward; R: Reverse. Em negrito estão marcadas as sequências dos iniciadores universais (F e R) utilizados no protocolo Pasteur de MLST. Todas as reações amplificadas foram submetidas à desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, 35 ciclos de desnaturação, anelamento, extensão e uma extensão final por 2 minutos a 72°C

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Frequência de cepas de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina

Um total de 551 isolados de *K. pneumoniae*, suspeitos de resistência a carbapenêmicos, foram enviados ao LACEN-DF no período de janeiro de 2014 a novembro de 2016. A resistência a polimixina E foi detectada em 94 cepas perfazendo um total de 17% dos isolados de *K. pneumoniae* reportados durante esse período ao LACEN-DF. Desse total, 152 isolados (94 resistentes à polimixina e 58 sensíveis) foram analisados nesse estudo.

5.2 Presença de genes de resistência *mcr* em isolados de *K. pneumoniae* resistente a carbapenem (KpRC)

Todos os 152 isolados de *K. pneumoniae* (94 resistentes à polimixina e 58 sensíveis) foram testados quanto à presença de genes *mcr* por PCR. Nenhum dos isolados testados foi positivo para *mcr-2*, *mcr-3* ou *mcr-4*. Contudo, o gene *mcr-1* foi detectado em quatro isolados de KpRC resistentes à polimixina (4,3% - 4/94) (Tabela 4). As quatro cepas positivas para *mcr-1* foram recuperadas de hospitais diferentes, mostrando a dispersão desse gene em Brasília (Tabela 4). Os fragmentos de amplificação de *mcr-1* foram confirmados por sequenciamento em 3 dos 4 isolados positivos e mostraram identidade de 94 a 98% (com cobertura de 82 a 91%) com a sequência de *mcr-1* de *K. pneumoniae* depositada no GenBank sob número KY706360 (Tabela 4).

Tabela 4 – Características apresentadas por cepas de KpRC positivas para *mcr-1*

Isolado	Hospital	Data isolamento	Gene <i>bla</i>	CIM Polimixina B	Integrid. <i>mgrB</i>	PCR p/ <i>mcr</i>	Alinhamento <i>mcr-1</i> – Genbank KY706360 (identidade - cobertura)
49.3841	A	03/set/2015	KPC	32 ug/mL	+	<i>mcr-1</i> ⁺	Não realizado
73.8845	B	04/abr/2016	KPC	4 ug/mL	+	<i>mcr-1</i> ⁺	94% - 82%
92.7315	C	12/out/2016	KPC	8 ug/mL	+	<i>mcr-1</i> ⁺	98% - 91%
93.2970	D	17/out/2016	NDM	16 ug/mL	+	<i>mcr-1</i> ⁺	98% - 82%

No Brasil, estudos relatam desde 2016 a presença de *mcr-1* em isolados de *E. coli* recuperados de praias em São Paulo, de animais de corte, e da ave marinha migratória pinguim-de-magalhães (FERNANDES *et al.*, 2017; FERNANDES *et al.*, 2016 B; LENTZ *et al.*, 2016; SELLERA *et al.*, 2017). Em relação a isolados clínicos, o primeiro relato de *mcr-1* ocorreu em 2016 envolvendo infecção em pé diabético por *Escherichia coli* (FERNANDES *et al.*, 2016 A). Estudos posteriores também mostraram a existência de isolados clínicos de *E. coli* portando *mcr-1* associado a ESBL ou KPC (CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2017). Ao contrário dos relatos de *mcr-1* em *E. coli*, ainda são escassos estudos brasileiros que mostrem a detecção de *mcr-1* em *K. pneumoniae*. Em relação a isolados clínicos de *K. pneumoniae*, é do nosso conhecimento que apenas três estudos já reportaram a presença de *mcr-1* em isolados de KpRC no Brasil. Semelhante aos nossos dados, estes estudos detectaram *mcr-1* em cepas de *K. pneumoniae* que portavam *bla_{KPC}* (AIRES *et al.*, 2017 A; DALMOLIN *et al.*, 2018; HIGASHINO *et al.*, 2018).

Isolados de *K. pneumoniae* portando *mcr-2* ainda não foram reportados no Brasil. O gene *mcr-2* tem sido raramente encontrado, sendo identificado até o momento em cepas de *E. coli* isoladas de suínos e bovinos na Bélgica (XAVIER *et al.*, 2016), apesar dos esforços para a detecção em isolados humanos (LIASSINE *et al.*, 2016; ZURFLUH *et al.*, 2017; CHAN *et al.*, 2018; DEL BIANCO *et al.*, 2018).

Diferente do gene *mcr-2*, *mcr-3* já foi encontrado em isolados clínicos de *Aeromonas veronii*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Salmonella* na Dinamarca, Tailândia, China e nos Estados Unidos (LI; YAN; LIU, 2017; LITRUP *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017; ROER *et al.*, 2017; YIN, *et al.*, 2017), entretanto no Brasil só foi encontrada em *E. coli* isolada de suínos (KIEFFER *et al.*, 2018 B).

5.3 Integridade do gene *mgrB* em isolados sensíveis e resistentes à polimixina

Ao analisar os produtos de amplificação do gene *mgrB*, todos os isolados sensíveis à polimixina (n = 58) apresentaram produtos de amplificação de tamanho em torno de 250 pb, correspondendo à extensão esperada para o gene íntegro (Tabela 5). Contudo, dentre os isolados resistentes (n = 94), 52 (55,3%) apresentaram produtos de amplificação medindo em torno de 1250pb, sugerindo a ocorrência de inserções de elementos genéticos (ISs). Em nossa coleção, a ocorrência de mutação insercional em *mgrB* foi estatisticamente associada a

resistência à polimixina apresentando nível de significância (p) menor que 0,0001 (Tabela 5). Outros três isolados resistentes não apresentaram ampliações do gene *mgrB*, resultado que sugere a deleção do *locus*. A deleção de *mgrB* foi confirmada utilizando iniciadores externos (EE_*mgrB*), posicionados a -668 nucleotídeos do start códon e +694 nucleotídeos do stop códon. Poucos estudos epidemiológicos relataram deleções de *mgrB* que são apontadas em aproximadamente 3% dos isolados resistentes a polimixina. Contudo, recentemente um estudo de sequenciamento genômico confirmou a deleção de uma sequência 5,4 Kb que incluía o gene *mgrB* (CANNATELLI *et al.*, 2014 B; OLAITAN *et al.*, 2014; CHENG *et al.*, 2015; BERNASCONI *et al.*, 2018). Desta forma, nossos resultados apontam que a mutagênese por inserção de ISs em *mgrB* é o mecanismo de resistência predominantemente detectado nos isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina recuperados em hospitais de Brasília.

Tabela 5 –Integridade do *amplicon mgrB* em isolados de *K. pneumoniae* sensíveis e resistentes à polimixina

Amplificado de <i>mgrB</i>	Isolados Sensíveis	Isolados Resistentes
	n = 58 (%)	n = 94 (%)
Íntegro*	58 (100)	39 (41,5)
Mutado#	0 ^a	55 (58,5) ^a
Inserção	0 ^b	52 (55,3) ^b
Deleção	0 ^c	3 (3,2) ^c

* apresentou fragmento de amplificação de DNA com o tamanho esperado

apresentou fragmento de amplificação de DNA diferente do tamanho esperado

^{a, b} indica p < 0,0001 (teste exato de Fisher) para a comparação entre dois grupos.

^c indica p < 0,01 (teste exato de Fisher) para a comparação entre dois grupos.

A inativação do *mgrB* é conhecida como o mecanismo mais comum de resistência à polimixina em cepas de KpRC (OLAITAN *et al.*, 2014; POIREL *et al.*, 2015). De forma semelhante, no Brasil a inserção de ISs em *mgrB* também é um mecanismo comum de resistência à polimixina, sendo reportado em aproximadamente 47% (22/46) dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* com resistência à polimixina (AIRES *et al.*, 2016; BRAUN *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2016; BRAUN *et al.*, 2018).

Quatorze *amplicons mgrB* de tamanho esperado (\approx 250 pb) e produzidos de isolados resistentes a polimixina foram submetidos à sequenciamento genético em

busca de possíveis mutações pontuais. Esses não apresentaram mutações pontuais na sequência codificadora. Provavelmente essas cepas apresentam mutações no sistema PhoPQ ou PmrAB, como já descrito na literatura e encontrado em alguns isolados no Brasil (BRAUN *et al.*, 2016). Ambos os sistemas não foram alvo deste estudo.

5.4 Identificação de ISs produzindo inserção mutacional em *mgrB*

Dos 52 isolados que apresentaram o *mgrB* amplificado de tamanho diferente do esperado, 50 tiveram os *amplicons* de *mgrB* submetidos ao sequenciamento para caracterizar os elementos genéticos que rompiam *mgrB*. Em 76% (38/50) dos isolados analisados foram identificados elementos de inserção da família IS5 com predomínio da sequência IS903 (30%, 15/50) que foi seguida por IS903B (26%, 13/50), ISKpn13 (12%, 6/50), IS102 (6%, 3/50) e ISKpn26 (2%, 1/50) (Tabela 6). Também foram identificados ISs das famílias IS3 (10%, 5/50), IS4 (8%, 4/50), IS1380 (4%, 2/50) e IS6 (2%, 1/50).

Em nossa coleção, o predomínio da família IS5 corrobora com o fato de que mutação insercional *mgrB*::IS5 é o mecanismo de resistência à polimixina predominantemente relatado pela literatura (CANNATELLI *et al.*, 2014 B; POIREL *et al.*, 2015; AIRES *et al.*, 2016; BRAUN *et al.*, 2016). No Brasil estudos sobre resistência a polimixina em *K. pneumoniae* já reportaram o IS903B da família IS5 rompendo *mgrB* em aproximadamente 42% das cepas resistentes à polimixina (AIRES *et al.*, 2016; BRAUN *et al.*, 2016). Em consonância com os dados epidemiológicos, o elemento IS903B parece ser comum em isolados de *K. pneumoniae* uma vez que está presente em 491 genomas de *K. pneumoniae* anotados no GenBank (ADAMS; BISHOP; WRIGHT, 2016). Em relação aos ISKpn13, IS903, ISKpn26 e IS102, pertencentes a família IS5, todos já foram encontrados rompendo o gene *mgrB*, inclusive no Brasil (PITT *et al.*, 2008; AIRES *et al.*, 2016; BRAUN *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2016).

Em nosso estudo, a família IS3 foi identificada em 10% das inserções que ocorreram em *mgrB* (Tabela 6). Em relação à família IS3, há poucos relatos deste tipo de elemento rompendo *mgrB*. É do nosso conhecimento, dois estudos que descreveram a família IS3 (IS3-like) rompendo o gene *mgrB* em *K. pneumoniae* (CANATELLI *et al.*, 2015; HALABY *et al.*, 2016). No Brasil, a sequência de inserção

ISAs22 foi reportada rompendo *mgrB* em isolados *K. pneumoniae* na cidade de São Paulo (BARTOLLETTI, 2016). Em relação ao ISsen4, não conhecemos relatos em artigos científicos indexados sobre este tipo de IS rompendo *mgrB* em *K. pneumoniae*. O ISsen4 já foi identificado em *Salmonella enterica* (CHEN *et al.*, 2017), bem como, em cepas de *Escherichia coli* e *Acinetobacter spp.*, envolvido na mobilização de gene *bla_{NDM-1}* (FU *et al.*, 2012; POIREL; BONNIN; NORDMANN, 2011; POIREL *et al.*, 2010). Para esclarecimento, a cepa *mgrB*:ISsen4 descrita aqui não portava *bla_{NDM-1}*.

Embora existam relatos sobre mutação insercional em *mgrB* envolvendo sequência da família IS4, a sequência de inserção IS10L só foi reportada em um estudo rompendo *mgrB* de um isolado proveniente de Brasília (AIRES *et al.*, 2016; POIREL *et al.*, 2015). Agora em nosso estudo, é mais uma vez reportado IS10L em 8% (4/50) dos isolados com mutação insercional em *mgrB*.

A sequência de inserção ISEcp1, da família IS1380, é frequentemente associada a cassetes de resistência, sobretudo portando genes de betalactamases. Na França, o gene de ESBL *bla_{CTX-M-15}* associado a ISEcp1 já foi encontrado irrompendo o gene *mgrB* (JAYOL *et al.*, 2016). Além do mais, ISEcp1 portando a carbapenemase *bla_{OXA-181}* já foi encontrada rompendo *mgrB* levando a resistência aos carbapenens e polimixina em isolados de *K. pneumoniae* recuperados nos Emirados Árabes Unidos (SONNEVEND *et al.*, 2017).

Apesar do elemento IS26 parecer ser comum no genoma de *K. pneumoniae*, estando presente em 494 genomas anotados, não há relatos do elemento de inserção IS26 ou da família IS6 rompendo o *mgrB* (ADAMS; BISHOP; WRIGHT, 2016). Em nossa coleção identificamos um isolado com genótipo *mgrB*:IS26.

Diferente da aquisição de *mcr-1*, o rompimento do *mgrB* parece não apresentar um elevado custo biológico (CANNATELLI *et al.*, 2015; TIETGEN *et al.*, 2018). Talvez este seja o motivo dos isolados apresentarem como mecanismo de resistência predominante o rompimento de *mgrB* por elementos de inserção.

Tabela 6 – Identificação e percentual de ocorrência de sequências de inserção (ISs) identificadas rompendo *mgrB*

Isolado	Extensão sequenciada do IS (pares de bases)	Identidade	E. value	Score (bits)	IS identificado (% ocorrência)	Família do IS (% ocorrência)	Grupo
71.1996	1666	97%	0.0	2898	ISEcp1 (4)	IS1380 (4)	–
83.7939	1642	99%	0.0	3205			
25.9026	1198	99%	0.0	2375	ISAs22 (8)	IS3 (10)	IS407
27.5364	1198	99%	0.0	2333			
20.9476	933	95%	0.0	1523			
50.5567	1193	99%	0.0	2327			
43.2671	1142	97%	0.0	2031			
7.8391	1329	99%	0.0	2591	IS10L (8)	IS4 (8)	IS10
13.8009	1329	99%	0.0	2568			
15.0916	1329	99%	0.0	2520			
35.3422	1330	99%	0.0	2535			
4.7650	1149	99%	0.0	2259	ISKpn13 (12)	IS5	IS5
36.7928	1102	99%	0.0	2136			
38.5505	1148	99%	0.0	2302			
42.1014	1148	99%	0.0	2306			
48.2019	1148	100%	0.0	2342			
89.6746	1148	99%	0.0	2275			
12.4601	1175	98%	0.0	2223	ISKpn26 (2)	IS5 (76)	IS903
79.2925	1057	99%	0.0	2035	IS102 (6)		
91.0997	1055	97%	0.0	1952			
99.6972	1058	97%	0.0	1923	IS903 (30)		
64.3170	1058	94%	0.0	1659			
65.9266	1057	97%	0.0	1850			
68.8841	1057	97%	0.0	1821			
69.5497	1057	97%	0.0	1847			
72.6033	1057	97%	0.0	1822			
74.5731	1057	97%	0.0	1818			
75.1463	1057	96%	0.0	1814			
77.4182	1057	96%	0.0	1770			
78.0555	1057	97%	0.0	1857			
81.8141	1057	96%	0.0	1844			
82.8963	1059	96%	0.0	1739			
88.9841	1057	97%	0.0	1819			
90.3639	1057	97%	0.0	1869			
97.0307	1050	96%	0.0	1804			
100.4852	1057	97%	0.0	1823			
9.8391	1046	95%	0.0	1693	IS903B (26)	IS903	
5.7646	1058	94%	0.0	1571			
6.3485	1055	95%	0.0	1707			
8.9223	1057	95%	0.0	1736			
11.8373	1024	95%	0.0	1658			
17.2022	1043	95%	0.0	1689			
23.1765	1057	97%	0.0	1815			
37.8433	1057	95%	0.0	1743			
44.6913	1046	95%	0.0	1694			
47.3749	683	94%	0.0	1036			

Continua

Isolado	Extensão sequenciada do IS (pares de bases)	Identidade	E. value	Score (bits)	IS identificado (% ocorrência)	Família do IS (% ocorrência)	Grupo
51.5592	1057	95%	0.0	1724			
66.2632	1040	95%	0.0	1657	IS903 (26)	IS5 (76)	IS903
94.5012	1025	95%	0.0	1634			
28.6433	820	100%	0.0	1646	IS26 (2)	IS6 (2)	-

5.5 Epidemiologia dos ISs associados mutação em *mgrB*

Ao dividirmos os isolados com genótipo *mgrB*::IS por tipo de amostra clínica, observamos que em amostras de swab retal e sangue (hemocultura e ponta de cateter) há uma maior diversidade de IS, ambos com seis diferentes ISs. Além do mais, isolados recuperados de swab retal e sangue responderam por 35% (17/49) e 29% (14/49) dos isolados *mgrB*::IS. Em swab retal observa-se uma frequência maior do IS903 (47%, 8/17), enquanto no sangue, IS903B (50% 7/14). A microbiota intestinal é conhecida como reservatório de determinantes genéticos de resistência aos antimicrobianos. Há uma abundância de espécies presentes nessa microbiota e o uso dos antimicrobianos, seja na terapêutica ou na agropecuária, seleciona genes de resistência entre as bactérias comensais e patógenos oportunistas que coexistem o intestino (SHOEMAKER *et al.*, 2001; VRIES *et al.*, 2011; ROLAIN, 2013; FRANCINO, 2016; CASALS-PASCUAL; VERGARA; VILA, 2018;). Em conjunto, nossos dados apontam que a microbiota intestinal pode ser um importante reservatório de ISs que predominantemente produzem resistência à polimixinas decorrentes de mutações insercionais em *mgrB*.

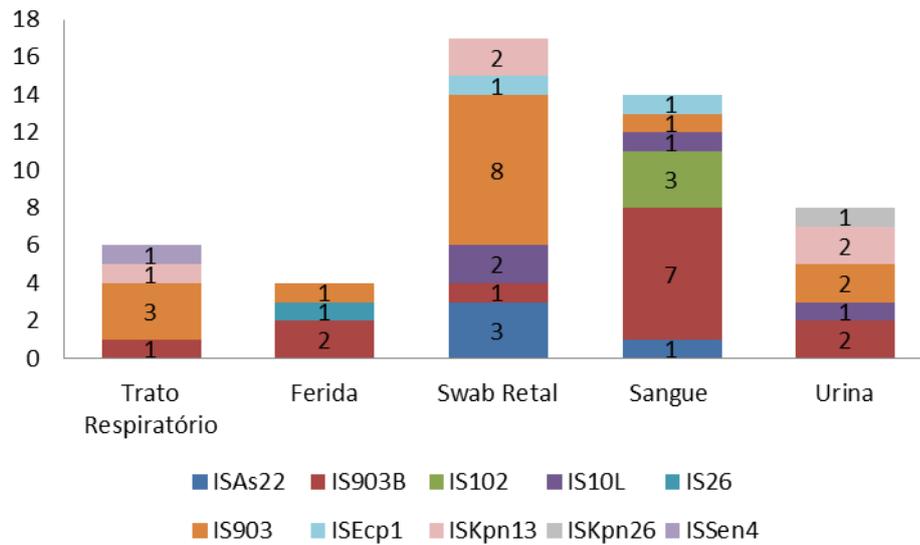


Figura 6 - Classificação de IS por tipo de amostra

*Foram considerados trato respiratório (aspirado endotraqueal e lavado brônquico) e sangue (hemocultura e ponta de cateter). Um isolado com *ISKpn13* não teve a amostra identificada.

5.6 Mapeamento de sítios de inserção mutacional em *mgrB*

Os sítios de inserção em *mgrB* e o sentido dos ISs (figura 6 e apêndice 1) foram mapeados na tentativa de definir possíveis padrões associados aos eventos de mutação envolvendo os ISs identificados. Os eventos de inserção mapeados ($n = 44$) ocorreram mais frequentemente em regiões codificadoras de *mgrB* (86%, 38/44) do que em região não codante (11%, 5/44) (figura 6). Dois loci em *mgrB* sofreram 68% das inserções detectadas em *mgrB*. Trinta e quatro por cento (15/44) das inserções foram localizadas na posição +116..+118; bem como 34% (15/44) das inserções ocorreram na região +69..+77 (Figura 6).

Na posição de inserção +116..+118 ocorreu o predomínio do IS903 que respondeu por 13 dos 15 eventos de mutação insercional neta posição. E em outro isolado o IS903 foi detectado na posição +60..+61. Quando comparado com dados da literatura, os pontos de inserção atingidos por IS903 em *mgrB* são diferentes daquelas encontradas em literatura (-22..-21; +70..+71) (UZ-ZAMAN *et al.*, 2018). Isso demonstra a versatilidade desse elemento de inserção em causar resistência à polimixina rompendo *mgrB*. A versatilidade de IS903 em determinar resistência a

antibióticos é também ratificada pelo relato de resistência a carbapenem induzida pela inserção no gene de porina *omp-36* (UZ ZAMAN *et al.*, 2014).

O segmento +69..+77 de *mgrB* parece constituir uma zona quente para eventos de inserção dada a diversidade de ISs detectada nesta posição: foram detectados cinco tipos diferentes de ISs. Quatro sequências de inserção diferentes pertenciam à família IS5 (IS903B, ISKpn13, ISKpn26 e IS102); uma pertencia a família IS4 (IS10L) (figura 6) .

No entanto para alguns ISs, o local de rompimento do gene *mgrB* parece acontecer de forma aleatória, uma vez que verificamos que diferentes sequências de inserção (ISKpn26, IS102, ISEcp1, IS903, IS903B) romperam em pontos diferentes do que já relatado na literatura (PITT *et al.*, 2008; CANATELLI *et al.*, 2015; SONNEVEND *et al.*, 2017 ; KIEFFER *et al.*, 2018 A; UZ-ZAMAN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018). Deste grupo de ISs, chamamos a atenção para IS903B que foi detectado em nove pontos diferentes de inserção atingindo *mgrB* (figura 6).

Apesar de terem sido identificados 13 isolados com IS903 rompendo o *mgrB* entre os nucleotídeos +117 e +118, sugerindo que este sítio seja ponto de inserção predominante desse IS. Contudo, em outros estudos o IS903 rompeu *mgrB* em cinco posições diferentes não apresentando ponto de inserção predominante (OLAITAN *et al.*, 2014; UZ ZAMAN *et al.*, 2014).

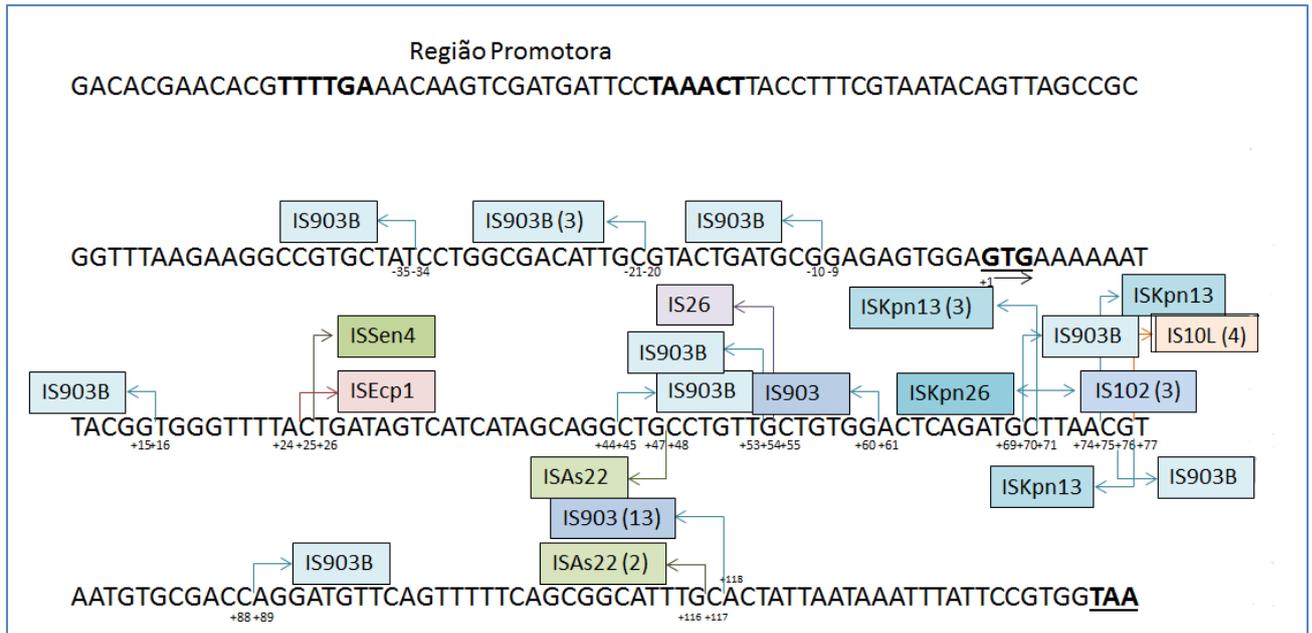


Figura 7 - Mapeamento de sítios de inserção mutacional em *mgrB*. As setas indicam a direção e o local do rompimento pela sequência de inserção. As cores indicam a família e os subtipos os diferentes tipos de sequências de inserção. As sequências em negrito marcam a região promotora. As sequências em negrito e sublinhadas indicam o códon de iniciação da tradução (marcado com uma seta) e o códon de término da tradução.

5.7 Tipos de sequência (ST) em isolados de KpRC sensíveis ou resistentes à polimixina (KpRCP)

Dentre as cepas que foram submetidas ao MLST observa-se que 42% (22/52) fazem parte do CC258 (apresentando ST11, ST340, ST437 ou ST855), sendo 37% pertencentes ao ST11 ou aos seus variantes SLV ou DLV (*locus variante duplo*). Noventa por cento (20/22) das cepas ST11 portavam *bla_{KPC}* (Tabela 8), corroborando com outros estudos brasileiros em que o ST11 predomina em cepas de *K. pneumoniae* portando *bla_{KPC}* (NICOLETTI *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013). Em nosso estudo, ST11 estava presente em todos os tipos de amostras bem como em cepas sensíveis à polimixina e em cepas KpRCP. Todas as quatro cepas KpRCP e positivas para *mcr-1* apresentaram ST11 ou SLV do ST11. E entre as cepas KpRCP com genótipo *mgrB*::IS submetidas ao MLST, cinco fazem parte do ST11 e portavam três tipos diferentes de ISs: IS903, ISAs22 e IS10L (Tabela 8). No Brasil, ainda não há relatos de cepas de *K. pneumoniae* pertencentes ao ST11 portando *mcr-1*, embora haja relatos de *mcr-1* em outros STs do CC258 (ST437) (DALMOLIN *et al.*, 2018; HIGASHINO *et al.*, 2018).

Além do ST11, observou-se que 25% das cepas KpRC submetidas ao MLST pertenciam ao ST2703 ou eram SLV do ST2703 (Tabela 8). No grupo ST2703, 77% (10/13) das cepas possuíam o *mgrB* rompido pelo IS903 na mesma posição (+117..+118) e orientação, indicando dispersão clonal de cepas KpRCP. Ademais, as cepas KpRCP ST2703 (*mgrB*::IS903) foram isoladas em quatro hospitais distintos e em períodos diferentes. Ao contrário das cepas que fazem parte do CC258, 92% (12/13) das cepas pertencentes ao ST2703 e seus variantes portavam *bla*_{N_{DM}}, além de demonstrarem resistência a aminoglicosídeo (9/13) e fosfomicina (11/13) (Tabela 8). Esse perfil de multirresistência dificulta sobremaneira o manejo de infecções causadas por *K. pneumoniae* multirresistentes, dado que esses antimicrobianos são usados em terapia combinada com polimixina, meropenem ou outros antimicrobianos (BASSETTI *et al.*, 2018). Apesar de nossos esforços de pesquisa, não conhecemos relatos epidemiológicos sobre ST2703. Neste trabalho, reconhecemos o potencial de dispersão do clone de KpRCP ST2703 portando *bla*_{N_{DM}} e mutação insercional *mgrB*::IS903.

Ao analisarmos a concentração inibitória mínima para polimixina B entre os isolados resistentes à polimixina, não foi possível visualizar padrões de susceptibilidade associado ao mecanismo de resistência detectado (*mcr* ou *mgrB*::IS), ou por tipos de ISs que rompem *mgrB* (Tabela 7, Tabela 8). A concentração inibitória mínima para polimixina B nas amostras positivas para *mcr-1* variou de 4 ug/mL a 32 ug/mL, enquanto nas amostras que tiveram o *mgrB* rompido por ISs, a variação foi de 2 ug/mL a >64 ug/mL.

Tabela 7 – Caracterização dos isolados com rompimento do *mgrB* produzido por ISs

Isolado	Resistência à Colistina	CIM Polimixina B	IS	Localização do IS	ST
4.7650	sim	16 ug/mL	ISKpn13	+74 +75	-
5.7646	sim	16 ug/mL	IS903	-	-
6.3485	sim	32 ug/mL	IS903B	+88 +89	-
7.8391	sim	16 ug/mL	IS10L	+76 +77	-
8.9223	sim	16 ug/mL	IS903B	+53 +54	-
9.8391	sim	16 ug/mL	IS903B	-21 - 20	11
11.8373	sim	16 ug/mL	IS903B	-34 - 35	-
12.4601	sim	16 ug/mL	ISKpn26	+70 +71	-
13.8009	sim	16 ug/mL	IS10L	+76 +77	-
15.0916	sim	32 ug/mL	IS10L	+76 +77	-
17.2022	sim	16 ug/mL	IS903B	-21 -20	11
20.9476	sim	16 ug/mL	F-ISAs22	-	-
23.1765	sim	2 ug/mL	IS903B	+75 +76	8
25.9026	sim	16 ug/mL	ISAs22	+116 +117	-
27.5364	sim	16 ug/mL	ISAs22	+116 +117	-
28.6433	sim	16 ug/mL	IS26	+54 +55	-
35.3422	sim	64 ug/mL	IS10L	+76 +77	-
36.7928	sim	16 ug/mL	ISKpn13	-	-
37.8433	sim	64 ug/mL	IS903B	+69 +70	-
38.5505	sim	16 ug/mL	ISKpn13	+70 +71	-
42.1014	sim	2 ug/mL	ISKpn13	+70 +71	-
43.2671	sim	32 ug/mL	ISSen4	+25 +26	-
44.6913	sim	32 ug/mL	IS903B	-10 -9	-
47.3749	sim	8 ug/mL	F-IS903B	-	11
48.2091	sim	2 ug/mL	ISKpn13	+70 +71	-
50.5567	sim	16 ug/mL	ISAs22	+47 +48	11
51.5592	sim	64 ug/mL	IS903B	+44 +45	-
64.3170	sim	16 ug/mL	IS903	-	2703
65.9266	sim	16 ug/mL	IS903	+117 +118	2703
66.2632	sim	8 ug/mL	IS903B	-21 - 20	-
68.8841	sim	64 ug/mL	IS903	+117 +118	2703
69.5497	sim	32 ug/mL	IS903	+117 +118	SLV ST2703
71.1996	sim	16 ug/mL	ISEcp1	-	-
72.6033	sim	32 ug/mL	IS903	+60 +61	2703
74.5731	sim	8 ug/mL	IS903	+117 +118	SLV ST2703
75.1463	sim	64 ug/mL	IS903	+117 +118	2703
77.4182	sim	32 ug/mL	IS903	+117 +118	2703
78.0555	sim	32 ug/mL	IS903	+117 +118	2703
79.2925	sim	16 ug/mL	IS102	+70 +71	SLV ST17
81.8141	sim	32 ug/mL	IS903	+117 +118	2703
82.8963	sim	16 ug/mL	IS903	+117 +118	-
83.7939	sim	8 ug/mL	ISEcp1	+24 +25	-
88.9841	sim	16 ug/mL	IS903	+117 +118	2703
89.6746	sim	16 ug/mL	ISKpn13	+76 +77	580
90.3639	sim	>64 ug/mL	IS903	+117 +118	-
91.0997	sim	32 ug/mL	IS102	+70 +71	-
94.5012	sim	4 ug/mL	IS903B	+15 +16	-
97.0307	sim	32 ug/mL	IS903	+117 +118	-
99.6972	sim	32 ug/mL	IS102	+70 +71	-
100.4852	sim	32 ug/mL	IS903	+117 +118	SLV ST2703

CIM: Concentração Inibitória Mínima. IS: Sequência de inserção. ST: Tipo de sequência. SLV: variante de locus único.

Tabela 8- Características associadas a STs e grupos clonais em cepas de KpRC sensíveis ou resistentes à polimixina (KpRCP)

Cepa	Data isolamento	Hospital	Amostra Clínica	Resistência à quinolonas	Resistência à aminoglicosídeos	Resistência à tigeccina	Resistência à nitrofuratoína	Resistência à fosfomicina	Resistência à colistina	CIM Polimixina B (ug/mL)	Gene bla	mcr	Integridade mgrb	IS	Localização do IS	ST	Locus variante
98.0193	15/nov/16	P1	Urina	x	x			x	x	16	NDM	negativo	íntegro			2832	
77.4182	26/abr/16	A	Urina	x				x	x	32	NDM	negativo	rompido	IS903	(+117+118)	2703	
74.5731	14/abr/16	A	Urina		x		x	x	x	8	NDM	negativo	rompido	IS903	(+117 +118)	2703	gapA
69.5497	20/mar/16	A	Fragmento de Tecido		x			x	x	32	NDM	negativo	rompido	IS903	(+117 +118)	2703	infB
100.4852	17/nov/16	A	Lavado brônquico		x			x	x	32	NDM	negativo	rompido	IS903	(+117 +118)	2703	phoE
68.8841	10/mar/16	F	Swab Retal	x			x		x	64	NDM	negativo	rompido	IS903	(+117 +118)	2703	
88.9841	02/out/16	A	Sangue		x			x	x	16	KPC+ NDM	negativo	rompido	IS903	(+117 +118)	2703	
65.9266	08/mar/16	F	Swab Retal	x	x	x		x	x	16	NDM	negativo	rompido	IS903	(+117 +118)	2703	
78.0555	03/mai/16	A	Swab Retal		x			x	x	32	NDM	negativo	rompido	IS903	(+117 +118)	2703	
81.8141	07/jun/16	A	Swab Retal		x			x	x	32	NDM	negativo	rompido	IS903	(+117 +118)	2703	
75.1463	14/abr/16	C	Swab Retal	x	x			x	x	64	NDM	negativo	rompido	IS903	(+117 +118)	2703	
72.6033	06/abr/16	A	Aspirado Endotraqueal						x	32	NDM	negativo	rompido	IS903	(+60 +61)	2703	
64.3170	15/mar/16	A	Aspirado Endotraqueal		x			x	x	16	NDM	negativo	rompido	IS903	-	2703	
63.4140	18/fev/16	E	Sangue					x	x	0.25	NDM	negativo	íntegro			2703	
126.5063	03/abr/16	A	Aspirado Endotraqueal	x			x	x		4	KPC	negativo	íntegro			2571	infB
30.3847	07/abr/15	F	Swab Retal	x			x	x	x	0.5	KPC	negativo	íntegro			2193	
107.8574	23/jan/16	F	Aspirado Endotraqueal	x	x					0.25	NDM	negativo	íntegro			1650	
23.1765	15/jan/15	E	Ponta de Cateter	x	x	x	x		x	2	KPC	negativo	rompido	IS903B	(+75 +76)	8	
32.3433	09/jun/15	G	Swab Retal						x	=<0.125	NDM	negativo	íntegro			716	
106.8551	21/jan/16	F	Swab Retal	x			x			4	NDM	negativo	íntegro			677	gapA e infB
89.6746	05/out/16	P2	Urina				x	x	x	16	NDM	negativo	rompido	ISKpn13	(+76 +77)	580	
103.1679	02/06/2015	P3	Swab Retal	x	x					1	NR	negativo	íntegro			520	
124.2006	25/mar/16	B	Sangue	x		x				=<0.125	NDM	negativo	íntegro			438	infB
109.7088	27/jan/16	B	Swab Retal	x	x	x				=<0.125	NDM	negativo	íntegro			438	infB

Continua

Cepa	Data isolamento	Hospital	Amostra Clínica	Resistência à quinolonas	Resistência à aminoglicosídeos	Resistência à tigeccina	Resistência à nitrofuratoína	Resistência à fosfomicina	Resistência à colistina	CIM Polimixina B (ug/mL)	Gene <i>bla</i>	<i>mcr</i>	Integridade <i>mgrb</i>	IS	Localização do IS	ST	Locus variante
128.3993	05/abr/16	B	Swab Retal	x	x	x				<0.125	NDM	negativo	íntegro			438	infB
105.8521	21/jan/16	F	Swab Retal	x			x			2	NDM	negativo	íntegro			147	
171.4486	NI	P5	Swab Retal	*	*	*	*	*	*	-	NDM	negativo	íntegro			120	
79.2925	09/mar/16	E	Sangue						x	16	KPC	negativo	rompido	IS102	(+70 +71)	17	infB
56.7767	16/nov/15	E	Urina	x					x	=<0.125	NDM	negativo	íntegro			15	
137.8630	23/abr/16	A	Sangue	x	x						NDM	negativo	íntegro			15	
101.1652	02/06/2015	P3	Urina		x		x			1	NR	negativo	íntegro			437	
46.9596	14/ago/15	P4	Fragmento de Tecido	x			x		x	16	KPC	negativo	íntegro			340	
26.7595	22/jan/15	E	Secreção	x			x	x	x	2	KPC	negativo	íntegro			855	
41.0230	05/jul/15	B	Sangue	x			x		x	32	KPC	negativo	íntegro			11	gapA e pgi
92.7315	12/out/16	C	NI	x			x		x	8	KPC	mcr-1	íntegro			11	gapA
73.8845	04/abr/16	B	Sangue	x		x	x	x	x	4	KPC	mcr-1	íntegro			11	gapA
17.2022	15/nov/14	A	Aspirado Endotraqueal	x		x	x		x	16	KPC	negativo	rompido	IS903B	(-21 -20)	11	
9.8391	21/set/14	A	Urina	x		x	x		x	16	KPC	negativo	rompido	IS903B	(-21 -20)	11	
47.3749	16/ago/15	A	Urina	x		x	x		x	8	KPC	negativo	rompido	F- IS903B	-	11	
70.9545	22/mar/16	B	Sangue	x			x		x	64	KPC	negativo	íntegro			11	
22.0126	15/jan/15	A	Aspirado Endotraqueal	x			x		x	16	KPC	negativo	íntegro			11	
49.3841	03/set/15	A	Urina	x			x		x	32	KPC	mcr-1	íntegro			11	
14.2357	02/nov/14	A	Swab Retal	x		x	x		x	1	KPC	negativo	íntegro			11	
86.8893	04/abr/16	B	Sangue	x			x			0.5	KPC	negativo	íntegro			11	
140.5222	27/abr/16	A	Aspirado Endotraqueal	x			x	x		1	KPC	negativo	íntegro			11	
50.5567	11/set/15	J	Ponta de Cateter	x					x	16	KPC	negativo	rompido	ISAs22	(+47 +48)	11	
40.2813	05/jul/15	P6	Abscesso abdominal	x		x	x		x	64	KPC	negativo	íntegro			11	
35.3422	11/jun/15	G	Swab Retal	x			x		x	64	KPC	negativo	rompido	IS10L	(+76 +77)	11	
59.2376	31/dez/15	E	Sangue	x	x		x		x	32	KPC	negativo	íntegro			11	
93.2970	17/out/16	D	Swab Retal	x	x	x	x		x	16	NDM	mcr-1	íntegro			11	
152.8512	15/set/16	B	Sangue	x	x		x			-	KPC	negativo	íntegro			11	
113.2885	04/fev/16	A	Líquido Peritoneal	x		x	x			2	KPC	negativo	íntegro			11	

* não encontrado antibiograma. NI: não informado. NR: não realizado. CIM: Concentração inibitória mínima. IS: Sequência de inserção. ST: Tipo de Sequência. Perfil de resistência analisado através do CIM liberado pelo MicroScan Walkaway. CIM polimixina B realizado por microdiluição em caldo manual.

6. CONCLUSÃO

Durante o período analisado, janeiro de 2014 a novembro de 2016, 17% dos isolados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenens (KpRC) também apresentaram resistência à polimixina (KpRCP). Em Brasília, principal mecanismo de resistência à polimixina detectado foi o rompimento de *mgrB* por elementos de inserção, sendo predominante as sequências de inserção da família IS5. Ao analisarmos o sítio de inserção mutacional, concluímos que a região entre os nucleotídeos +69 e +77 constitui um sítio de inserção predominante em *mgrB* dada a diversidade de IS a atingir este ponto. Dez cepas de KpRCP ST2703 apresentaram o *mgrB* rompido por IS903 (*mgrB*::IS903) entre os nucleotídeos +117 e +118.

Também foi identificado pela primeira vez em Brasília, quatro cepas KpRC portando o gene plasmidial *mcr-1*. As cepas *mcr-1*-positivas faziam parte do ST11 ou são variantes de *locus* único.

Em Brasília, a resistência à polimixina em cepas de KpRC é conduzida por grupos clonais definidos (ST2703 e ST11) e frequentemente baseada em mutações insercionais em *mgrB* conduzidas por IS903. Neste cenário, identificamos a emergência do clone de KpRCP ST2703 de genótipo $bla_{NDM}^+ - mgrB::(+117)IS903$.

7. PERSPECTIVAS

- Ampliar a caracterização sobre perfil de susceptibilidade das cepas ST2703-*bla*_{NDM}⁺-*mgrB*::(+117)IS903.
- Determinar a estabilidade do inserto *mgrB*::(+117)IS903 nas cepas de *K. pneumoniae*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUOUN, M.; STUBBERFIELD, E. J.; DUGGETT, N. A.; KIRCHNER, M.; DORMER, L.; NUNEZ-GARCIA, J.; RANDALL, L. P.; LEMMA, F.; CROOK, D. W.; TEALE, C.; SMITH, R. P.; ANJUM, M. F. *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 73, n. 10, p. 2904, out, 2018

ADAMS, M. D.; BISHOP, B.; WRIGHT, M. S. Quantitative assessment of insertion sequence impact on bacterial genome architecture. **Microbial Genomics**, v. 2, n. 7, p. 1-13, jul, 2016

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3074203/Boletim+de+Seguran%C3%A7a+do+Paciente+e+Qualidade+em+Servi%C3%A7os+de+Sa%C3%BAde+n%C2%BA+14+Avalia%C3%A7%C3%A3o+dos+indicadores+nacionais+das+Infec%C3%A7%C3%B5es+Relacionadas+%C3%A0+Assist%C3%Aancia+%C3%A0+Sa%C3%BAde+%28IRAS%29+e+Resist%C3%Aancia+microbiana/dbd57c96-937f-45d3-93fd-e76684b7f35c>>. Acesso em 08 de out. de 2017.

AIRES, C. A. M.; DA CONCEIÇÃO-NETO, O. C.; TAVARES E OLIVEIRA, T. R.; DIAS, C. F.; MONTEZZI, L. F.; PICÃO, R. C.; ALBANO, R. M.; ASENSI, M. D.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D. Emergence of the Plasmid-Mediated *mcr-1* Gene in Clinical KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, p.1-3, jul, 2017 (A)

AIRES, C. A. M.; PEREIRA, P. S.; ASENSI, M. D.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D. *mgrB* Mutations Mediating Polymyxin B Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Rectal Surveillance Swabs in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n.11, p.6969-6972, nov, 2016

AIRES, C. A. M.; PEREIRA, P. S.; DE ARAUJO, C. F. M.; CHAGAS, T. P. G.; OLIVEIRA, J. C. R.; BUONORA, S. N.; ALBANO, R. M.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D.; ASENSI, M. D. Multiclonal Expansion of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.61, n.4, p.1-6, abr, 2017 (B)

ANDRADE, L. N.; CURIAO, T.; FERREIRA, J. C.; LONGO, J. M.; CLÍMACO, E. C.; MARTINEZ, R.; BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; BASILE-FILHO, A.; EVARISTO, M. A.; DEL PELOSO, P. F.; RIBEIRO, V. B.; BARTH, A. L.; PAULA, M. C.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R.; DARINI, A. L. C.; COQUE, T. M. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae Species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.7, p. 3579–3583, jul, 2011

ASH, C.; PRIEST, F. G.; COLLINS, M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.64, p. 253–260, 1993

BARON, S.; HADJADJ, L.; ROLAIN, J. M.; OLAITAN, A. O. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 583-591, ago, 2016

BARTH, N.; RIBEIRO, V. B.; ZAVASCKI, A. P. In Vitro Activity of Polymyxin B plus Imipenem, Meropenem, or Tigecycline against KPC-2-Producing Enterobacteriaceae with High MICs for These Antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, n.6, p. 3596–3597, mar, 2015

BARTOLLETI, Flávia. **Avaliação da relação genética e perfil de sensibilidade de *Klebsiella pneumoniae* resistentes à polimixina B**. 2016. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

BASSETTI, M.; RIGHI, E.; CARNELUTTI, A.; GRAZIANO, E.; RUSSO, A. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: challenges for treatment, prevention and infection control. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 16, p. 749-761, out, 2018

BEM, A. E.; VELIKOVA, N.; PELLICER, M. T.; BAARLEN, P. V.; MARINA, A.; WELLS, J. M. Bacterial histidine kinases as novel antibacterial drug targets. **ACS Chemical Biology**, v. 10, n. 1, p. 213-224, jan, 2015

BERNASCONI, O. J.; DONÀ, V.; PIRES, J.; KUENZLI, E.; HATZ, C.; LUZZARO, F.; PERRETEN, V.; ENDIMIANI, A. Deciphering the complete deletion of the *mgrB* locus in an unusual colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate colonising the gut of a traveller returning from India. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p. 529-531, mar, 2018

BOGDANOVICH, T.; ADAMS-HADUCH, J. M.; TIAN, G. B.; NGUYEN, M. H.; KWAK, E. J.; MUTO, C. A.; DOI, Y. Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 4, p.373-376, ago, 2011

BOROWIAK, M.; FISCHER, J.; HAMMERL, J. A.; HENDRIKSEN, R. S.; SZABO, I.; MALORNY, B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 12, p. 3317-3324, dez, 2017

BOWERS, D. R.; CAO, H.; ZHOU, J.; LEDESMA, K. R.; SUN, D.; LOMOVSKAYA, O.; TAM, V. H. Assessment of minocycline and polymyxin B combination against *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2720-2725, maio, 2015

BRAUN, G.; CAYÔ, R.; BARBOSA, A. C.; GALES, A. C. In-vivo emergence of polymyxin- B-resistant *Klebsiella pneumoniae* in patients with bloodstream infections. **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 4, p. 338-340, dez, 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, set, 2018

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – BrCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos, 2018

BROWN, P.; DAWSON, M. J. Development of new polymyxin derivatives for multi-drug resistant Gram-negative infections. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 4, p. 386-394, abr, 2017

CAI, Y.; LEE, W.; KWA, A. L. Polymyxin B versus colistin: an update. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 13, n. 12, p. 1481-1497, out, 2015

CALFEE, D. P. Recent advances in the understanding and management of *Klebsiella pneumoniae*. **F1000Research**, v. 6, n.1760, p. 1-9, set, 2017

CAMPOS, M. A.; VARGAS, M. A.; REGUEIRO, V.; LLOMPART, C. M.; ALBERTÍ, S.; BENGOCHEA, J. A. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 12, p. 7107-7114, dez, 2004

CANNATELLI, A.; D'ANDREA, M. M.; GIANI, T.; DI PILATO, V.; ARENA, F.; AMBRETTI, S.; GAIBANI, P.; ROSSOLINI, G. M. 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

CANNATELLI, A.; DI PILATO, V.; GIANI, T.; ARENA, F.; AMBRETTI, S.; GAIBANI, P.; D'ANDREA, M. M.; ROSSOLINI, G. M. *In Vivo* Evolution to Colistin Resistance by PmrB Sensor Kinase Mutation in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Is Associated with Low-Dosage Colistin Treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4399–4403, ago, 2014 (A)

CANNATELLI, A.; GIANI, T.; D'ANDREA, M. M.; DI PILATO, V.; ARENA, F.; CONTE, V.; TRYFINOPOULOU K; COLGRIT STUDY GROUP; VATOPOULOS, A.; ROSSOLINI, G. M. MgrB Inactivation Is a Common Mechanism of Colistin Resistance in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* of Clinical Origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 5696–5703, out, 2014 (B)

CANNATELLI, A.; SANTOS-LOPEZ, A.; GIANI, T.; GONZALEZ-ZORN, B.; ROSSOLINI, G. M. Polymyxin resistance caused by *mgrB* inactivation is not associated with significant biological cost in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n.5, p. 2898-2900, fev, 2015

CARATTOLI, A.; VILLA, L.; FEUDI, C.; CURCIO, L.; ORSINI, S.; LUPPI, A.; PEZZOTTI, G.; MAGISTRALI, C. F. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Euro Surveillance**, v. 22, n. 31, p. 1-5, ago, 2017

CASALS-PASCUAL, C.; VERGARA, A.; VILA, J. Intestinal microbiota and antibiotic resistance: Perspectives and solutions. **Human Microbiome Journal**, v.9, p. 11-15, ago, 2018

CHAN, W. S.; AU, C. H.; HO, D. N.; CHAN, T. L.; MA, E. S.; TANG, B. S. Prospective study on human fecal carriage of Enterobacteriaceae possessing *mcr-1* and *mcr-2* genes in a regional hospital in Hong Kong. **BMC Infectious Diseases**, 2018

CHAVDA, B.; LV, J.; HOU, M.; CHAVDA, K. D.; KREISWIRTH, B. N.; FENG, Y., CHEN, L; YU, F. Co-identification of *mcr-4.3* and *bla_{NDM-1}* in a Clinical *Enterobacter cloacae* Isolate from China. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n.10, p.1-6, out, 2018

CHEN, C. L.; SU, L. H.; JANAPATLA, R. P.; LIN, C. Y.; CHIU, C. H. Genetic analysis of virulence and antimicrobial-resistant plasmid pOU7519 in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, p. 1-11, dez, 2017

CHEN, L. F.; ANDERSON, D. J.; PATERSON, D. L. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. **Infection and Drug Resistance**, v. 5, p.133-141, set, 2012

CHEN, L.; MATHEMA, B.; CHAVDA, K. D.; DELEO, F. R.; BONOMO, R. A.; KREISWIRTH, B. N. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 12, p. 686–696, dez, 2014

- CHENG, Y. H.; LIN, T. L.; PAN, Y. J.; WANG, Y. P.; LIN, Y. T.; WANG, J. T. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2909-2913, maio, 2015
- CLEGG, S.; MURPHY, C. N. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology Spectrum**, v.4, n. 1 p.1-17, fev, 2016
- CONCEIÇÃO-NETO, O. C.; AIRES, C. A. M.; PEREIRA, N. F.; DA SILVA, L. H. J.; PICÃO, R. C.; SIQUEIRA, B. N.; ALBANO, R. M.; ASENSI, M. D.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 2, p. 282-284, ago, 2017
- CZEKANSKA, E. M. Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. **Methods in Molecular Biology**, v. 740, p. 27-32, mar, 2011
- DALMOLIN, T. V.; MARTINS, A. F.; ZAVASCKI, A. P.; DE LIMA-MORALES, D.; BARTH, A. L. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 2, p. 132-133, fev, 2018
- DEL BIANCO, F.; MOROTTI, M.; PEDNA, M. F.; FARABEGOLI, P.; SAMBRI, V. Microbiological surveillance of plasmid mediated colistina resistance in human Enterobacteriaceae isolates in Romagna (Northern Italy): August 2016-July 2017. **International Journal of Infectious Diseases**, 2018
- DIANCOURT, L.; PASSET, V.; VERHOEF, J.; GRIMONT, P. A.; BRISSE, S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4178-4182, ago, 2005
- EVANS, M. E.; FEOLA, D. J.; RAPP, R. P. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 33, n. 9, p. 960-967, set, 1999
- FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K.; TSIODRAS, S.; MICHALOPOULOS, A. The use of intravenous and aerosolized polymyxins for the treatment of infections in critically ill patients: a review of the recent literature. **Clinical Medicine & Research**, v. 4, n. 2, p. 138-46, jun, 2006

FERNANDES, M. R.; MCCULLOCH, J. A.; VIANELLO, M. A.; MOURA, Q.; PÉREZ-CHAPARRO, P. J.; ESPOSITO, F.; SARTORI, L.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; LIRA, D. P.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the *mcr-1* Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a Human Infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n.10, p. 6415-6417, set, 2016

FERNANDES, M. R.; MOURA, Q.; SARTORI, L.; SILVA, K. C.; CUNHA, M. P.; ESPOSITO, F.; LOPES, R.; OTUTUMI, L. K.; GONÇALVES, D. D.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; MONTE, D. F.; LANDGRAF, M.; FRANCISCO, G. R.; BUENO, M. F.; DE OLIVEIRA GARCIA, D.; KNÖBL, 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 surveillance**, v. 21, n. 17, p. 1-6, abr, 2016 B

FERNANDES, M.R.; SELLERA, F. P.; ESPOSITO, F.; SABINO, C. P.; 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, jun, 2017

FRANCINO, M. P. Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances. **Frontiers in microbiology**, v.6, p. 1-11, jan, 2016

FU, Y.; DU, X.; JI, J.; CHEN, Y.; JIANG, Y.; YU, Y. Epidemiological characteristics and genetic structure of *bla_{NDM-1}* in non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2114–2122, set, 2012

GARCIA-GRAELLS, C; KEERSMAECKER, S. C. J.; VANNESTE, K.; POCHET, B.; VERMEERSCH, K.; ROOSENS, N.; DIERICK, K.; BOTTELDOORN, N. Detection of plasmid-mediated colistin resistance, *mcr-1* and *mcr-2* genes, in *Salmonella* spp. isolated from food at retail in Belgium from 2012 to 2015. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, p. 114–117, fev, 2018

GARG, S. K.; SINGH, O.; JUNEJA, D.; TYAGI, N.; KHURANA, A. S.; QAMRA, A.; MOTLEKAR, S.; BARKATE, H. Resurgence of Polymyxin B for MDR/XDR Gram-Negative Infections: An Overview of Current Evidence. **Critical care research and practice**, p. 1-10, jul, 2017

GUNN, J. S. The Salmonella PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 284-290, jun, 2008

HADJADJ, L.; RIZIKI, T.; ZHU, Y.; LI, J.; DIENE, S. M.; ROLAIN, J. M. Study of *mcr-1* Gene-Mediated Colistin Resistance in *Enterobacteriaceae* Isolated from Humans and Animals in Different Countries. **Genes**, v. 8, n. 12, p. 1-16, dez, 2017

HALABY, T.; KUCUKKOSE, E.; JANSSEN, A. B.; ROGERS, M. R.; DOORDUIJN, D. J.; VAN DER ZANDEN, A. G.; AL NAIEMI, N.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; VAN SCHAİK, W. Genomic Characterization of Colistin Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* during a Nosocomial Outbreak. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6837-6843, out, 2016

HAMMERL, J. A.; BOROWIAK, M.; SCHMOGER, S.; SHAMOUN, D.; GROBBEL, M.; MALORNY, B.; TENHAGEN, B. A.; KÄSBOHRER, A. *mcr-5* and a novel *mcr-5.2* variant in *Escherichia coli* isolates from food and food-producing animals, Germany, 2010 to 2017, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 5, p.1433-1435, maio, 2018

HANCOCK, R. E. W. Peptide antibiotics. **The Lancet**, v. 349, n. 9042, p. 418-422, fev, 1997

HIGASHINO, H. R.; MARCHI, A. P.; MARTINS, R. C. R.; BATISTA, M. V.; PERDIGÃO NETO, L. V.; LIMA, V. A. C. C.; ROSSI, F.; GUIMARÃES, T.; LEVIN, A. S.; ROCHA, V.; COSTA, S. F. Colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-harboring KPC and MCR-1 in a Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit. **Bone Marrow Transplantation**, p. 1-3, nov, 2018

JAYOL, A.; NORDMANN, P.; BRINK, A.; POIREL, L. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p.2780-2784, maio, 2015

JAYOL, A.; NORDMANN, P.; DESROCHES, M.; DECOUSSER, J. W.; POIREL, L. Acquisition of Broad-Spectrum Cephalosporin Resistance Leading to Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 3199-3201, abr, 2016

JAYOL, A.; POIREL, L.; BRINK, A.; VILLEGAS, M.-V.; YILMAZ, M.; NORDMANN, P. Resistance to Colistin Associated with a Single Amino Acid Change in Protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* Isolates of Worldwide Origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4762–4766, ago, 2014

KIDD, T. J.; MILLS, G.; SÁ-PESSOA, J.; DUMIGAN, A.; FRANK, C. G.; INSUA, J. L.; INGRAM, R.; HOBLEY, L.; BENGOCHEA, J. A. A *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance mechanism that subdues host defences and promotes virulence. **EMBO Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p.430-447, abr, 2017

KIEFFER, N.; AHMED, M. O.; ELRAMALLI, A. K.; DAW, M. A.; POIREL, L.; ÁLVAREZ, R.; NORDMANN, P. Colistin-resistant carbapenemase-producing isolates among *Klebsiella spp.* and *Acinetobacter baumannii* in Tripoli, Libya. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, p. 37–39, jun, 2018 (A)

KIEFFER, N; NORDMANN, P.; MORENO, A. M.; MORENO, L. Z.; CHABY, R., BRETON, A., TISSIÈRES, POIREL, L. Genetic and Functional Characterization of an MCR-3-Like Enzyme-Producing *Escherichia coli* Isolate Recovered from Swine in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 7, p. 1-8, jun, 2018 (B)

KOMURA, S; KURAHASHI, K. Partial purification and properties of L-2,4-diaminobutyric acid activating enzyme from a polymyxin E producing organism. **Journal of biochemistry**, v. 86, n. 4, p. 1013–1021, out, 1979

KWA, A.; KASIAKOU, S. K.; TAM, V. H.; FALAGAS, M. E. Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E). **Expert review of anti-infective therapy**, v. 5, n. 5, p.811-821, out, 2007

LENTZ, S. A.; DE LIMA-MORALES, D.; CUPPERTINO, V. M.; NUNES, L. DE S.; DA MOTTA, A. S.; ZAVASCKI, A. P.; BARTH, A. L.; MARTINS, A. F. *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. **Euro surveillance**, v. 21, n. 26, p. 1-2, jun, 2016

LI, B.; ZHAO, Y.; LIU, C.; CHEN, Z.; ZHOU, D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. **Future microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1071-1081, set, 2014

LI, J.; NATION, R. L.; MILNE, R. W.; TURNIDGE, J. D.; COULTHARD, K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 1, p.11-25, jan, 2005

LI, Y.; YAN, W. J.; LIU, S. Q. Investigation of colistin resistance gene *mcr* in gut bacteria from patients with acute diarrheal. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 97, n. 47, p. 3720-3723, 2017

LIASSINE, N.; ASSOUVIE, L.; DESCOMBES, M. C.; TENDON, V. D.; KIEFFER, N.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract Enterobacteriaceae in Switzerland. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, p. 4-5, out, 2016

LITRUP, E.; KIIL, K.; HAMMERUM, A. M.; ROER, L.; NIELSEN, E. M.; TORPDAHL, M. Plasmid-borne colistin resistance gene *mcr-3* in *Salmonella* isolates from human infections, Denmark, 2009–17. **Eurosurveillance**, v. 22, n.31, p. 1-3, ago, 2017

LIU, L.; FENG, Y.; ZHANG, X. MCNALLY, A.; ZONG, Z. New Variant of *mcr-3* in an Extensively Drug-Resistant *Escherichia coli* Clinical Isolate Carrying *mcr-1* and *bla_{NDM-5}*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 12, dez, 2017

LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L. F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J. H.; SHEN, J. 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, nov, 2016

LUO, J.; YAO, X.; LV, L.; DOI, Y.; HUANG, X.; HUANG, S.; LIU, J.H. Emergence of *mcr-1* in *Raoultella ornithinolytica* and *Escherichia coli* Isolates from Retail Vegetables in China . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 10, p. 1-4, out, 2017

MA, S.; SUN, C.; HULTH, A.; LI, J.; NILSSON, LE.; ZHOU, Y.; BÖRJESSON, S.; BI, Z.; BI, Z.; SUN, Q.; WANG Y. Mobile colistin resistance gene *mcr-5* in porcine *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1777–1780, 2018

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre : Artmed, 2016

MARTINS, W. M. B. S.; NICOLETTI, A. G.; SANTOS, S. R.; SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Frequency of BKC-1-Producing *Klebsiella* Species Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 5044-5046, jul, 2016

MAVROIDI, A.; KATSIARI, M.; LIKOUSI, S.; PALLA, E.; ROUSSOU, Z.; NIKOLAOU, C.; MAGUINA, A.; PLATSOUKA, E. D. Characterization of ST258 Colistin-Resistant, *bla*_{KPC} -Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek Hospital. **Microbial drug resistance**, v. 22, n. 5, p.392-8, jul, 2016

MITROPHANOV, A. Y.; JEWETT, M. W.; HADLEY, T. J.; GROISMAN, E. A. Evolution and dynamics of regulatory architectures controlling polymyxin B resistance in enteric bacteria. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 10, p. 1-11, out, 2008

MONTAGNE, M.; MARTEL, A. ; LE MOUAL, H. Characterization of the Catalytic Activities of the PhoQ Histidine Protein Kinase of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 5, p. 1787–1791, mar, 2001

MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–334, jan, 2009

MOYER, J. H.; MILLS, L. C., YOW, E. M. Toxicity of polymyxin B. I. Animal studies with particular reference to evaluation of renal function. **Archives of internal medicine**, v. 92, n. 2, p. 238-47, ago, 1953

MUNOZ-PRICE, L. S.; POIREL, L.; PHD, BONOMO, R. A.; SCHWABER, M. J.; DAIKOS, G. L.; CORMICAN, M.; CORNAGLIA, G.; GARAU, J.; GNIADKOWSKI, M.; HAYDEN, M. K.; KUMARASAMY, K.; LIVERMORE, D. M.; MAYA, J. J.; NORDMANN, P.; PATEL, J. B.; PATERSON, D. L.; PITOUT, J.; VILLEGAS, M. V.; WANG, H.; WOODFORD, N.; QUINN, J. P. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 13, n. 9, p. 785–796, set, 2013

NATION, R. L.; LI, J.; CARS, O.; COUET, W.; DUDLEY, M. N.; KAYE, K. S.; MOUTON, J. W.; PATERSON, D. L.; TAM, V. H.; THEURETZBACHER, U.; TSUJI, B. T.; TURNIDGE, J. D. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 15, n. 2, p. 225-34, fev, 2015

NICOLETTI, A. G.; FEHLBERG, L. C. C.; PICÃO, R. C.; MACHADO, A. DE O.; GALES, A. C. Clonal Complex 258, the Most Frequently Found Multilocus Sequence Type Complex in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated in Brazilian Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4563-4564, ago, 2012

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 593-656, dez, 2003

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791-1798, out, 2011

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000

OLAITAN, A. O.; DIENE, S. M.; KEMPF, M.; BERRAZEG, M.; BAKOUR, S.; GUPTA, S. K.; THONGMALAYVONG, B.; AKKHAVONG, K.; SOMPHAVONG, S.; PABORIBOUNE, P.; CHAISIRI, K.; KOMALAMISRA, C.; ADELOWO, O. O.; FAGADE, O. E.; BANJO, O. A.; OKE, A. J.; ADLER, A.; ASSOUS, M. V.; MORAND, S.; RAOULT, D.; ROLAIN, J. M. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator *mgrB*: an epidemiological and molecular study. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 6, p. 500-507, set, 2014

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 1-18, nov, 2014

PACZOSA, M. K.; MECASAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 80, n. 3, p. 629–661, jun, 2016

PARTRIDGE, S. R.; DI PILATO, V.; DOI, Y.; FELDGARDEN, M.; HAFT, D. H.; KLIMKE, W.; KUMAR-SINGH, S.; LIU, J. H.; MALHOTRA-KUMAR, S.; PRASAD, A.; ROSSOLINI, G. M.; SCHWARZ, S.; SHEN, J.; WALSH, T.; WANG, Y.; XAVIER, B. B. Proposal for assignment of allele numbers for mobile colistin resistance (mcr) genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 10, p. 2625-2630, out, 2018

PEREIRA, P. S.; BORGHI, M.; ALBANO, R. M.; BERIÃO, G. C.; LOPES, J. C. O.; ASENSI, M. D.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D. First description of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, P1196, Poster Session V, Worldwide spread of carbapenem resistance, 2014. Disponível em: <https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/material/?mid=16818>. Acesso em 22 fev 2018

PEREIRA, P. S.; DE ARAUJO, C. F.; SEKI, L. M.; ZAHNER, V.; CARVALHO-ASSEF, A. P.; ASENSI, M. D. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 312-316, fev, 2013

PITOUT, J. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 10, pag. 5873-5884, set, 2015

PITT, M. E.; ELLIOTT, A. G.; CAO, M. D.; GANESAMOORTHY, D.; KARAIKOS, I.; GIAMARELLOU, H.; ABOUD, C. S.; BLASKOVICH, M. A. T.; COOPER, M. A.; COIN, L. J. M. Multifactorial chromosomal variants regulate polymyxin resistance in extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Genomics**, v.4, p.1-11, fev, 2018.

POIREL, L.; BONNIN, R. A.; NORDMANN, P. Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput

genome sequencing. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4224-4229, set, 2011

POIREL, L.; JAYOL, A.; BONTRON, S.; VILLEGAS, M. V.; OZDAMAR, M.; TÜRKÖGLÜ, S.; NORDMANN, P. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 75-80, jan, 2015

POIREL, L.; LAGRUTTA, E.; TAYLOR, P.; PHAM, J.; NORDMANN, P. Emergence of metallo- β -lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4914-1916, nov, 2010

POMAKOVA, D. K.; HSIAO, C. B.; BEANAN, J. M.; OLSON, R.; MACDONALD, U.; KEYNAN, Y.; RUSSO, T. A. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and under-recognized pathogenic variant. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 6, p. 981-989, jun, 2012

REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations, 2016. Disponível em: < https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf>. Acesso em 18 out 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. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p.1-22, nov, 2016

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. **Cell Viability Assays**. Maio, 2013 [Atualizado julho, 2016]. In: SITTAMPALAM, G. S. *et al.*, editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>>. Acesso em 30 mar 2019

ROCHA, I. V.; ANDRADE, C. A. D. N.; CAMPOS, T. L.; REZENDE, A. M.; LEAL, N. C.; VIDAL, C. F. L.; XAVIER, D. E. Ciprofloxacin-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST410 strain carrying the *mcr-1* gene associated with bloodstream infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 5, p. 655-656, maio, 2017

ROER, L.; HANSEN, F.; STEGGER, M.; SÖNKSEN, U. W.; HASMAN, H.; HAMMERUM, A. M. Novel *mcr-3* variant, encoding mobile colistin resistance, in an ST131 *Escherichia coli* isolate from bloodstream infection, Denmark, 2014. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 31, p. 1- 5, 2017

ROLAIN, J. M. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p.1-10, 2013

SEKI, L. M.; PEREIRA, P. S.; DE SOUZA, M. DA P.; CONCEIÇÃO, M. DE S.; MARQUES, E. A.; PORTO, C. O.; COLNAGO, E. M.; ALVES, C. DE F.; GOMES, D.; ASSEF, A. P.; SAMUELSEN, Ø.; ASENSI, M. D. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 70, n. 2, p. 274-277, jun, 2011

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

SENNATI, S.; DI PILATO, V.; RICCOBONO, E.; DI MAGGIO, T.; VILLAGRAN, A. L.; PALLECCHI, L.; BARTOLONI, A.; ROSSOLINI, G. M.; GIANI, T. *Citrobacter braakii* carrying plasmid-borne *mcr-1* colistin resistance gene from ready-to-eat food from a market in the Chaco region of Bolivia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.72, n. 2, p. 2127-2129, jul, 2017

SHEN, Y.; XU, C.; SUN, Q.; SCHWARZ, S.; OU, Y.; YANG, L.; HUANG, Z.; EICHHORN, I.; WALSH, T. R.; WANG, Y.; ZHANG, R.; SHEN, J.; Prevalence and Genetic Analysis of *mcr-3*-Positive *Aeromonas* Species from Humans, Retail Meat,

and Environmental Water Samples. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n.9, p. 1-10, set, 2018

SHEN, Z.; WANG, Y.; SHEN, Y.; SHEN, J.; WU, C. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 16, n. 3, p. 293, mar, 2016

SHOEMAKER, N. B., VLAMAKIS, H., HAYES, K., & SALYERS, A. A. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 2, p. 561-568, 2001

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

SNESRUD, E.; MAYBANK, R.; KWAK, Y. I.; JONES, A. R.; HINKLE, M. K.; MCGANN, P. Chromosomally Encoded *mcr-5* in Colistin-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n.8, p. 1-5, ago, 2018

SONNEVEND, Á.; GHAZAWI, A.; HASHMEY, R.; HAIDERMOTA, A.; GIRGIS, S.; ALFARESI, M.; OMAR, M.; PATERSON, D. L.; ZOWAWI, H. M.; PÁL, T. Multi-hospital Occurrence of Pan-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 147 with an ISEcp1-Directed blaOXA-181 Insertion in the *mgrB* Gene in the United Arab Emirates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, p. 1-9, jun, 2017

SRINIVAS, P.; RIVARD, K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. **Current infectious disease reports**, v. 19, n. 38, p. 1-9, set, 2017

STORM, D. R.; ROSENTHAL, K. S.; SWANSON, P. E. Polymyxin and related peptide antibiotics. **Annual review of biochemistry**, v. 46, p. 723-763, jul, 1977.

SUN, J.; XU, Y.; GAO, R.; LIN, J.; WEI, W.; SRINIVAS, S., LI, D.; YANG, R.-S.; LI, X.-P.; LIAO, X.-P.; LIU, Y.-H.; FENG, Y. 2017. Deciphering MCR-2 colistin resistance. **mBio**, v. 8, n. 3, p. 1-16, maio, 2017

TIETGEN, M.; SEMMLER, T.; RIEDEL-CHRIST, S.; KEMPF, V. A. J.; MOLINARO, A.; EWERS, C.; GÖTTIG, S. Impact of the colistin resistance gene *mcr-1* on bacterial fitness. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 51, n.4, p.554-561, 2018

TRIMBLE, M. J.; MLYNÁRČIK, P.; KOLÁŘ, M.; HANCOCK, R. E. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v. 6. n.10. p 1-22, 2016

TZOUVELEKIS, L. S.; MARKOGIANNAKIS, A.; PSICHOGIOU, M.; TASSIOS, P. T.; DAIKOS, G. L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other *Enterobacteriaceae*: an Evolving Crisis of Global Dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 682-707, out, 2012

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, v. 11, n.10, p. 479-487, out, 2003

UZ ZAMAN, T.; ALBLADI, M.; SIDDIQUE, M. I.; AL JOHANI, S. M.; BALKHY, H. H. Insertion element mediated *mgrB* disruption and presence of IS*Kpn28* in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Saudi Arabia. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1183-1187, ago, 2018

UZ ZAMAN, T.; ALDREES, M.; AL JOHANI, S. M.; ALRODAYYAN, M.; ALDUGHASHEM, F. A.; BALKHY, H. H. Multi-drug carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection carrying the OXA-48 gene and showing variations in outer membrane protein 36 causing an outbreak in a tertiary care hospital in Riyadh, Saudi Arabia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 28, p.186-192, set., 2014

VELKOV, T.; ROBERTS, K. D. ; NATION, R. L.; THOMPSON, P. E.; LI, J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. **Future microbiology**, v. 8, n. 6, p. 1-20, jun, 2013

VOULGARI, E.; GARTZONIKA, C.; VRIONI, G.; POLITI, L.; PRAIVALI, E.; LEVIDIOTOU-STEFANOY, S.; TSAKRIS, A. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69, n. 8, p. 2091-2097, ago, 2014

VRIES, L. E.; VALLÈS, Y.; AGERSØ, Y.; VAISHAMPAYAN, P. A.; GARCÍA-MONTANER, A.; KUEHL, J. V.; CHRISTENSEN, H.; BARLOW, M.; FRANCINO, M.

P. The gut as reservoir of antibiotic resistance: microbial diversity of tetracycline resistance in mother and infant. **PloS one**, v. 6, n. 6,p. 1-11, jun, 2011

WAILAN, A. M.; PATERSON, D. L. The spread and acquisition of NDM-1: a multifactorial problem. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 12, n. 1, p.91-115, jan, 2014

WANG, X.; WANG, Y.; ZHOU, Y.; LI, J.; YIN, W.; WANG, S.; ZHANG, S.; SHEN, J.; SHEN, Z.; WANG, Y. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging microbes & infections**, v. 7, n.122 , p. 1-9, jul, 2018

WANG, X.; WANG, Y.; ZHOU, Y.; WANG, Z.; WANG, Y.; ZHANG, S.; SHEN, Z. Emergence of Colistin Resistance Gene *mcr-8* and Its Variant in *Raoultella ornithinolytica*. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p. 1-5, fev, 2019

WANG, X.; ZHAI, W.; LI, J.; LIU, D.; ZHANG, Q.; SHEN, Z.; WANG, S.; WANG, Y. Presence of an *mcr-3* variant in *Aeromonas caviae*, *Proteus mirabilis*, and *Escherichia coli* from one domestic duck. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 62, n. 2, setp. 1-10, 2018

WANG, Y.; TIAN, G. B.; ZHANG, R.; SHEN, Y.; TYRRELL, J. M.; HUANG, X.; ZHOU, H.; LEI, L.; LI, H. Y.; DOI, Y.; FANG, Y.; REN, H.; ZHONG, L. L.; SHEN, Z.; ZENG, K. J.; WANG, S.; LIU, J. H.; WU, C.; WALSH, T. R.; SHEN, J. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1* -positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. 390–399, abr,2017

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 Surveillance**, v. 21, n. 27, p. 1-6, jul, 2016

XIANG, R.; YE, X.; TUO, H.; ZHANG, X.; ZHANG, A.; LEI, C.; YANG, Y.; WANG, H. Co-occurrence of *mcr-3* and *bla_{NDM-5}* genes in multidrug-resistant *Klebsiella*

pneumoniae ST709 from a commercial chicken farm in China. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n.4, p.519-520, out, 2018

XIANG, R.; YE, X.; TUO, H.; ZHANG, X.; ZHANG, A.; LEI, C.; YANG, Y.; WANG, H. Co-occurrence of *mcr-3* and *bla_{NDM-5}* genes in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST709 from a commercial chicken farm in China. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.52, n. 4, p. 519-520, out, 2018

YANG, Y. Q.; LI, Y. X.; LEI, C. W.; ZHANG, A. Y.; WANG, H. N. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.73, n.7, abr, 2018

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J. W.; STEWARD, C. D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F. C. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, abr, 2001

YIN, W.; LI, H.; SHEN, Y.; LIU, Z.; WANG, S.; SHEN, Z.; ZHANG, R.; WALSH, T. R.; SHEN, J.; WANG, Y. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. **mBio**, v. 8, n. 3, p. 1-6, jun, 2017

YONG, D.; TOLEMAN, M. A.; GISKE, C. G.; CHO, H. S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T. R. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p.5046-5054, dez, 2009

ZHANG, R.; DONG, N.; HUANG, Y.; ZHOU, H.; XIE, M.; CHAN, E. W.; HU, Y.; CAI, J.; CHEN, S. Evolution of tigecycline- and colistin-resistant CRKP (carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*) in vivo and its persistence in the GI tract. **Emerging microbes & infections**, v. 7, pag. 1-11, jul, 2018

ZURFLUH, K.; STEPHAN, R.; WIDMER, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P.; NÜESCH, H.-J.; HÄCHLER, H.; NÜESCH-INDERBINEN, M. Screening for fecal carriage of MCR-producing Enterobacteriaceae in healthy humans and primary care

patients. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v.6, n.28, p. 1-4, mar, 2017

APÊNDICE 1

Perfil alélico dos tipos de sequências (ST) identificados.

Cepa	ST	Rpob (501pb)	GAP (450pb)	MDH (477pb)	PGI (432 pb)	PhoE (420pb)	InfB (318 pb)	tonB (414pb)
9.8391	11	1	3	1	1	1	3	4
14.2357	11	1	3	1	1	1	3	4
17.2022	11	1	3	1	1	1	3	4
22.0126	11	1	3	1	1	1	3	4
23.1765	8	5	4	1	1	1	1	6
26.7595	855	1	3	1	1	1	3	26
30.3847	2193	1	15	1	1	1	3	4
32.3433	716	4	71	1	2	16	1	164
35.3422	11	1	3	1	1	1	3	4
40.5813	11	1	3	1	1	1	3	4
41.0230	DLV ST11	1	148	1	46	1	3	4
46.9596	340	1	3	1	1	1	3	18
47.3749	11	1	3	1	1	1	3	4
49.3841	11	1	3	1	1	1	3	4
50.5567	11	1	3	1	1	1	3	4
56.7767	15	1	1	1	1	1	1	1
59.2376	11	1	3	1	1	1	3	4
63.4140	2703	8	2	11	1	9	1	24
64.3170	2703	8	2	11	1	9	1	24
65.9266	2703	8	2	11	1	9	1	24
68.8841	2703	8	2	11	1	9	1	24
69.5497	SLV 2703	8	2	11	1	9	9	24
70.9545	11	1	3	1	1	1	3	4
72.6033	2703	8	2	11	1	9	1	24
73.8845	SLV ST11	1	44	1	1	1	3	4
74.5731	SLV ST2703	8	4	11	1	9	1	24
75.1463	2703	8	2	11	1	9	1	24
77.4182	2703	8	2	11	1	9	1	24
78.0555	2703	8	2	11	1	9	1	24
79.2925	SLV ST17	4	2	1	1	4	61	4
81.8141	2703	8	2	11	1	9	1	24
86.8893	11	1	3	1	1	1	3	4
88.9841	2703	8	2	11	1	9	1	24
89.6746	580	4	3	6	1	9	4	38
92.7315	SLV ST11	1	44	1	1	1	3	4
93.2970	11	1	3	1	1	1	3	4
98.0193	2832	1	1	1	1	1	1	401
100.4852	SLV ST2703	8	2	11	1	7	1	24
101.1652	437	1	3	1	1	1	3	31

Continua

Cepa	ST	Rpob (501pb)	GAP (450pb)	MDH (477pb)	PGI (432 pb)	PhoE (420pb)	InfB (318 pb)	tonB (414pb)
103.1679	520	4	2	19	1	10	1	37
105.8521	147	4	3	6	1	7	4	38
106.8551	DLV ST677	4	44	6	1	1	1	38
107.8574	ST1650	1	1	1	1	7	4	1
109.7088	SLV 438	4	3	6	1	1	1	4
113.2885	11	1	3	1	1	1	3	4
124.2006	SLV ST438	4	3	6	1	1	3	4
126.5063	SLV ST2571	1	3	1	1	7	4	4
128.3993	SLV ST438	4	3	6	1	1	1	4
137.8630	15	1	1	1	1	1	1	1
140.5222	11	1	3	1	1	1	3	4
152.8512	11	1	3	1	1	1	3	4
171.4486	120	4	44	1	1	7	4	38

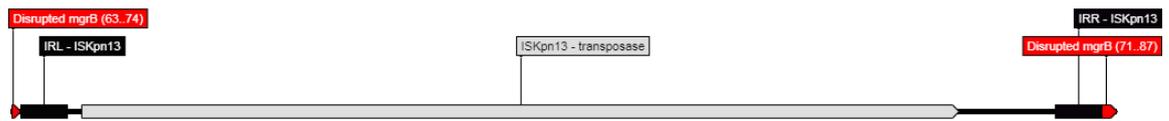
ST: Tipo de sequência. SLV: variante de *locus* único. DLV: variante de *locus* duplo. GapA: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. InfB: fator de iniciação da tradução 2. Mdh: malato desidrogenase. Pgi: Fosfoglicose isomerase. PhoE: Fosforina E. RpoB: sub-unidade beta da RNA polimerase B. TonB: Transdutor de energia periplasmática.

APENDICE 2

Mapa físico de ISs identificados rompendo *mgrB*.

Números acima e a esquerda de cada figura indicam em sequência a identificação das cepas e a extensão dos ISs.

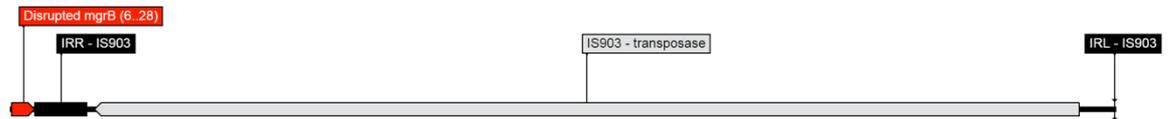
4.7650
1176 bp



WebDSV v1.1

www.molbioltools.com

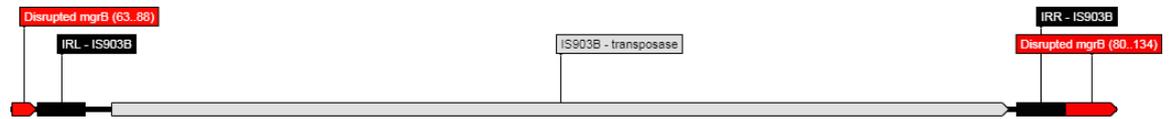
5.7646
1070 bp



WebDSV v2.0

www.molbioltools.com

6.3485
1139 bp



WebDSV v1.1

www.molbioltools.com

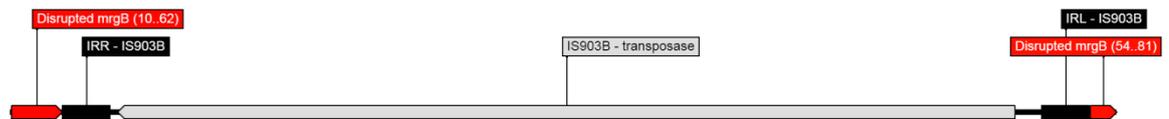
7.8391
1473 bp



WebDSV v1.1

www.molbioltools.com

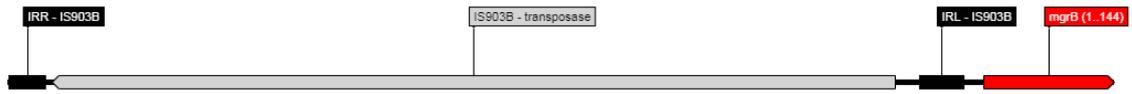
8.9223
1138 bp



WebDSV v2.0

www.molbioltools.com

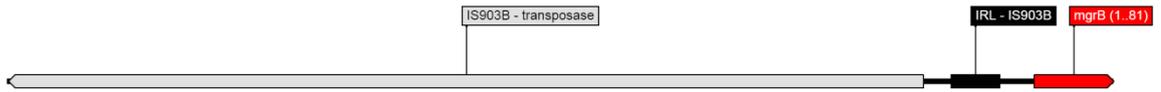
9.8391
1212 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

11.8373
1115 bp



WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

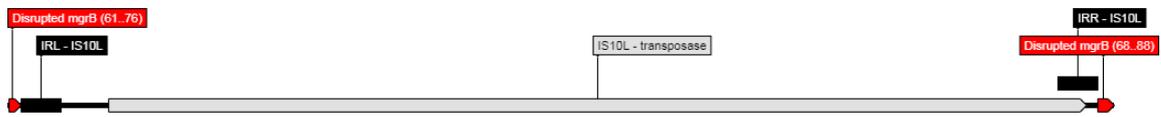
12.4601
1220 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

13.8009
1366 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

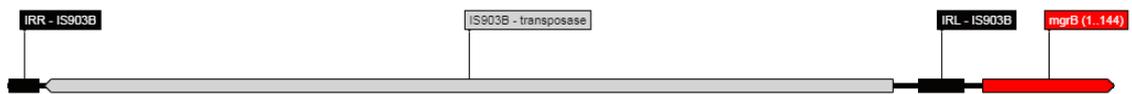
15.0916
1356 bp



WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

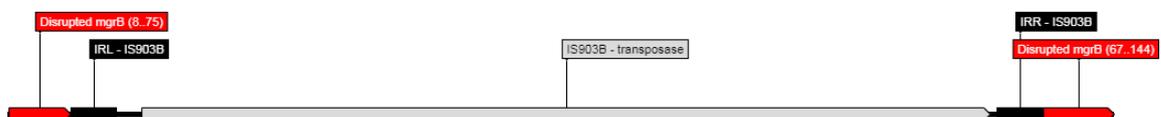
17.2022
1204 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

23.1765
1203 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

25.9026
1338 bp



WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

27.5364
1257 bp



WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

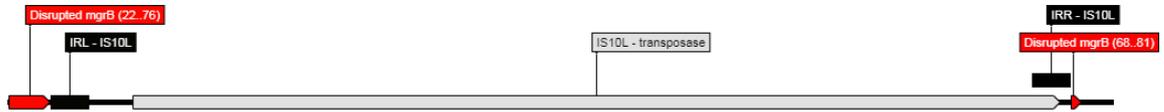
28.6433
900 bp



WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

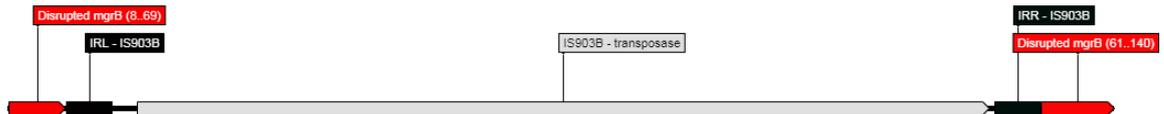
35.3422
1442 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

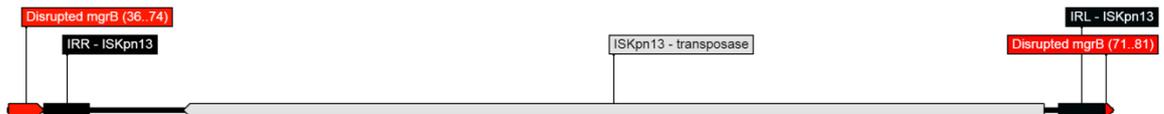
37.8433
1199 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

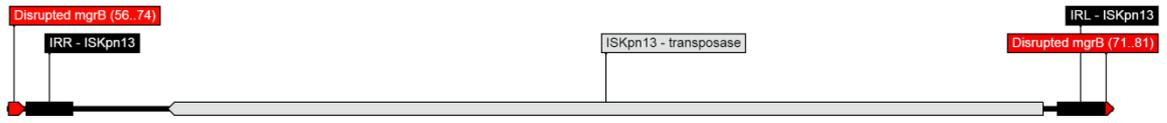
38.5505
1198 bp



WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

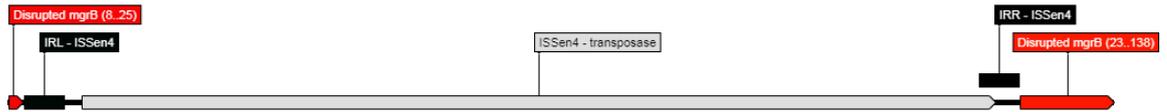
42.1014
1178 bp



WebDSV v2.0
43.2671
1359 bp

www.molbioltools.com

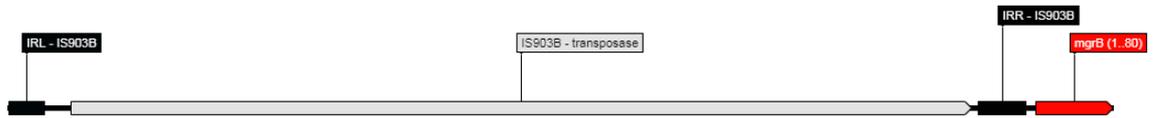
43.2671
1359 bp



WebDSV v1.1
44.6913
1134 bp

www.molbioltools.com

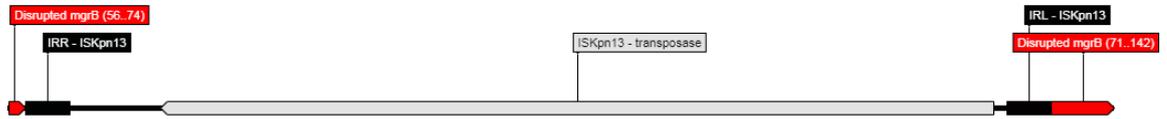
48.2091
1238 bp



WebDSV v1.1
48.2091
1238 bp

www.molbioltools.com

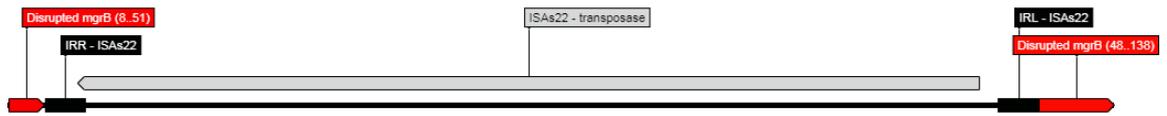
50.5567
1333 bp



WebDSV v1.1
50.5567
1333 bp

www.molbioltools.com

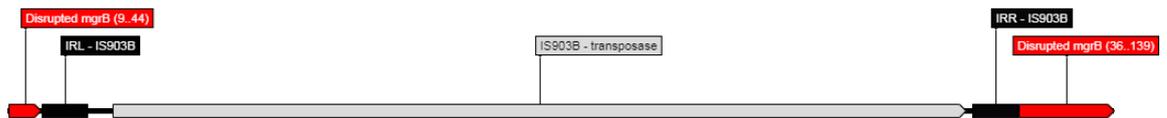
51.5592
1197 bp



WebDSV v1.1
51.5592
1197 bp

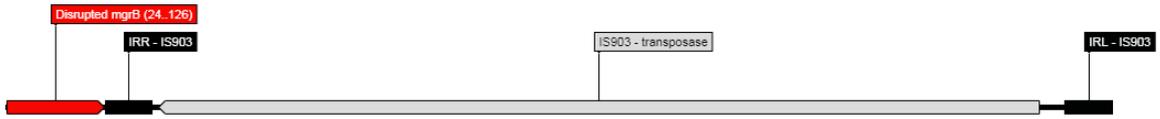
www.molbioltools.com

WebDSV v1.1



www.molbioltools.com

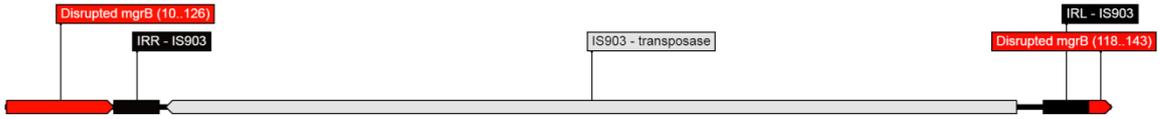
64.3170
1160 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

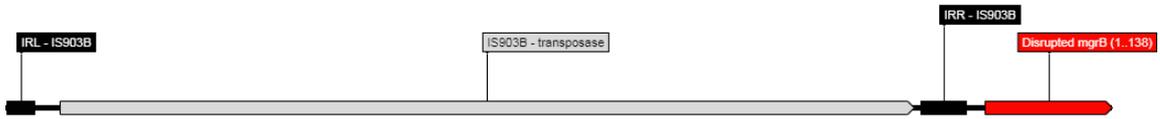
65.9266
1200 bp



WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

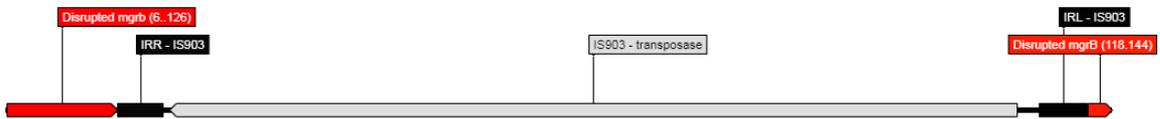
66.2632
1197 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

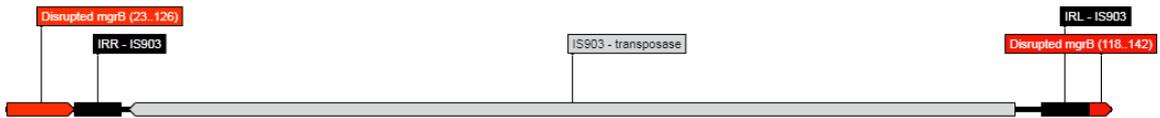
68.8841
1205 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

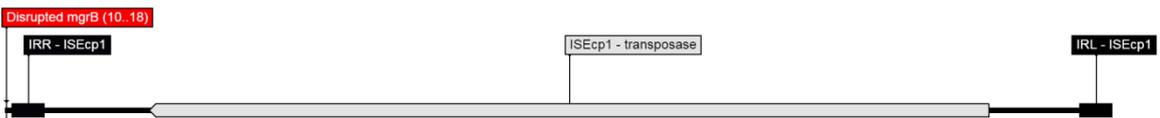
69.5497
1153 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

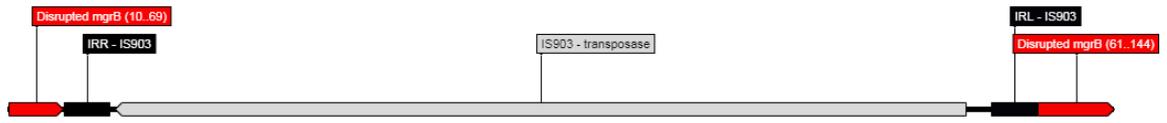
71.1996
1666 bp



WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

72.6033
1201 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

74.5731
1201 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

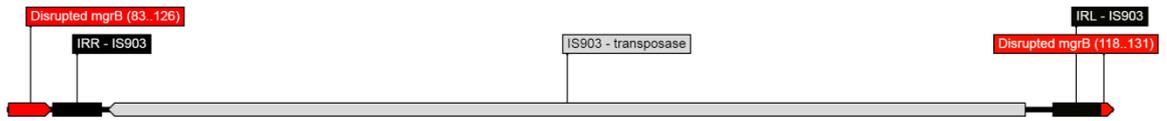
75.1463
1205 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

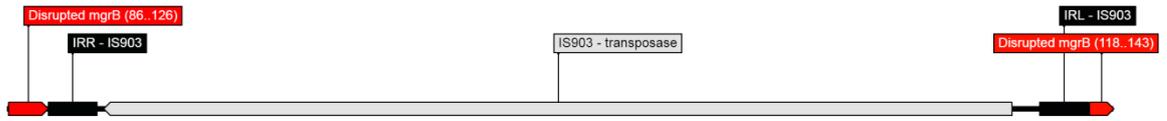
77.4182
1111 bp



WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

78.0555
1124 bp



WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

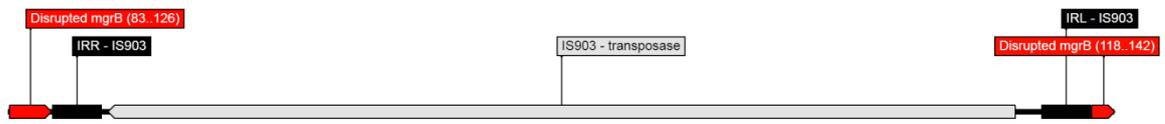
79.2925
1138 bp



WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

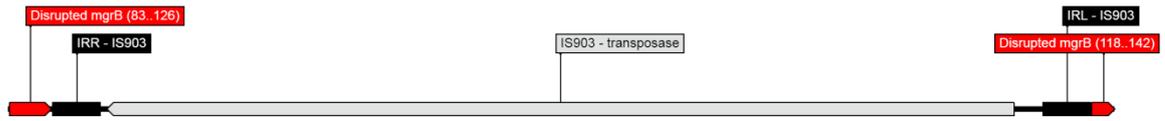
81.8141
1126 bp



WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

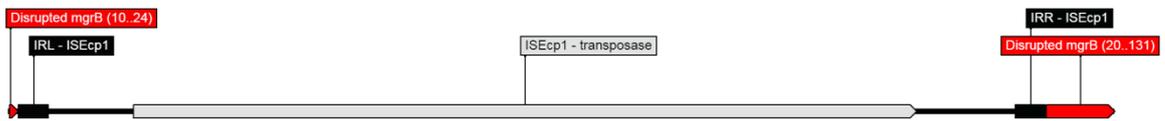
82.8963
1130 bp



WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

83.7939
1784 bp



WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

88.9841
1188 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

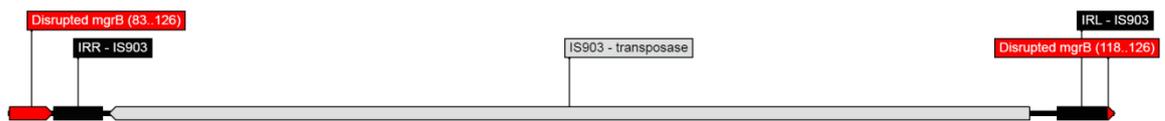
89.6746
1316 bp



WebDSV v1.1

www.molbiotools.com

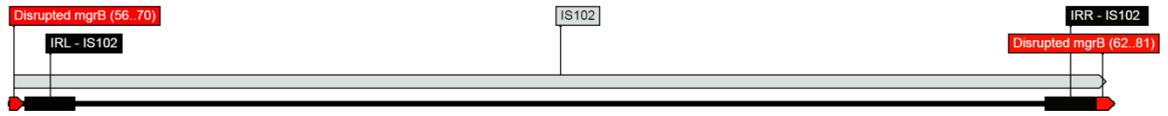
90.3639
1110 bp



WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

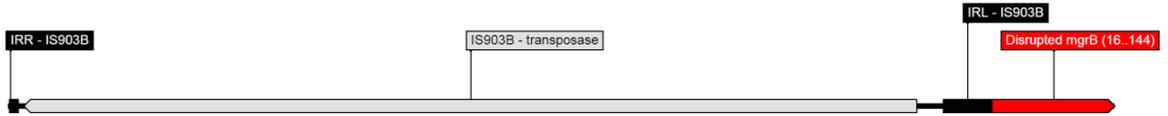
91.0997
1092 bp



WebDSV v2.0

www.molbioltools.com

94.5012
1148 bp



WebDSV v2.0

www.molbioltools.com

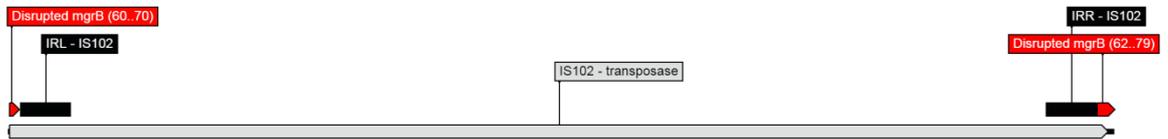
97.0307
1111 bp



WebDSV v1.1

www.molbioltools.com

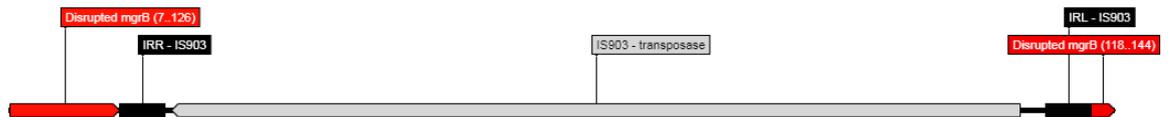
99.6972
1087 bp



WebDSV v2.0

www.molbioltools.com

100.4852
1204 bp



WebDSV v1.1

www.molbioltools.com