



## RESISTÊNCIA A COLISTINA EM ISOLADOS DE *SALMONELLA* DE CASOS CLÍNICOS DE SUÍNOS NO BRASIL

Meneguzzi, M.<sup>1</sup>, Pissetti, C.<sup>2</sup>, Rebelatto, R.<sup>3</sup>, Kuchiishi, S.S.<sup>4</sup>, Costa, A.T.R.<sup>5</sup>, Guedes, R.M.C.<sup>6</sup>, Leão, J.A.<sup>7</sup>, Kich, J.D.<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal Catarinense - Campus Concórdia, Curso de Medicina Veterinária

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

<sup>3</sup>Embrapa Suínos e Aves, e-mail: [jalusa.kich@embrapa.br](mailto:jalusa.kich@embrapa.br)

<sup>4</sup>Centro de diagnóstico de Saúde Animal - Cedisa

<sup>5</sup>Instituto de Pesquisas Veterinárias Especializadas LTDA - IPEVE

<sup>6</sup>Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

<sup>7</sup>Mercolab Laboratórios LTDA

**PALAVRAS-CHAVE:** Polimixina E, resistência antimicrobiana, gene *mcr-1*, suíno.

### INTRODUÇÃO

Sulfato de colistina (Polimixina E) é um antimicrobiano peptídeo catiônico com atividade bactericida que atua contra bactérias Gram-negativas. É amplamente utilizada na suinocultura para a prevenção e tratamento de infecções causadas por enterobactérias. Além disso, em alguns países tem o seu uso permitido como aditivo zootécnico (10). Entretanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera esta droga como uma das substâncias antimicrobianas criticamente importantes para a saúde humana, sendo considerado o antimicrobiano de última eleição para determinadas enfermidades decorrentes de bactérias multirresistentes (13).

Em novembro de 2015, foi publicado o primeiro caso de resistência antimicrobiana à colistina mediada pelo gene *mcr-1* presente em plasmídeo de *Escherichia coli* de alimentos, animais e humanos na China (7). Após este relato, outros estudos demonstraram a rápida disseminação deste gene na maioria dos continentes (11). Devido este alerta e recomendações de organizações internacionais, como a própria OMS, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) emitiu uma instrução normativa proibindo o uso desta substância na alimentação animal, com o objetivo de aditivo zootécnico melhorador de desempenho, sendo liberado seu uso para o tratamento de enfermidades (4). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de resistência antimicrobiana frente à colistina em isolados de *Salmonella enterica* provenientes de casos clínicos de septicemia e entéricos de suínos utilizando duas técnicas de teste de suscetibilidade antimicrobiana: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e disco difusão. Paralelamente foi pesquisado a presença do gene *mcr-1* nestes isolados.

### MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de 2016 e 2017, 133 isolados clínicos de *Salmonella enterica* provenientes de quatro laboratórios veterinários foram enviados à Embrapa Suínos e Aves. Estes isolados se originaram de diagnóstico laboratorial de casos clínicos septicêmicos e entéricos de suínos, distribuídos em nove estados brasileiros. Duas técnicas de suscetibilidade antimicrobiana foram utilizadas contra colistina. A primeira, por meio do teste disco difusão em Agar Muller-Hinton, seguindo as orientações recomendadas pelo documento VET 01-S2 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Como o documento do CLSI não contém a interpretação para colistina, a determinação do diâmetro da zona de suscetibilidade/resistência do disco (10 µg), seguiu o seguinte parâmetro previamente utilizado (6): resistência ≤ 11 mm e suscetibilidade ≥ 14 mm. Para avaliar a distribuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, conforme recomendações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Para interpretação do *cut-off* foi utilizado o parâmetro de ≤ 2 µg/mL para suscetível e >2 µg/mL para resistente (1). Como controle de qualidade dos procedimentos, foi utilizada a cepa *Escherichia coli* ATCC® 25922 nos testes fenotípicos. Todos os isolados foram submetidos à pesquisa do gene *mcr-1*, através da técnica de PCR. Para isso, os *primers* utilizados foram CLR5-F (5' CCG TCA GTC CGT TTG TTC 3') e CLR5-R (5' CTT GGT CGG TCT GTA GGG 3') (7).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a técnica de disco difusão em ágar para determinar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana frente à colistina, 44,3% (59/133) dos isolados apresentaram um halo ≥ 14 mm (Tabela 1), sendo classificados como suscetíveis (6); já 33,8% (45/133) apresentaram um perfil considerado intermediário, ou seja, com um halo entre 12 e 13 mm, demonstrando que estes isolados apresentam uma tendência à resistência a esta droga. Porém, a técnica em ágar não é recomendada pelos comitês internacionais de padronização de testes de resistência antimicrobiana, como o CLSI e EUCAST. As moléculas de polimixinas são consideradas grandes, e desta maneira, se difundem inadequadamente no ágar, produzindo zonas de inibição inconsistentes (3).

Quando comparados os resultados das duas técnicas, a CIM apresentou um número maior de isolados resistentes 84/133 (63,1%) do que a disco difusão 29/133 (21,8%) como pode ser visto nas Tabelas 1 e 2. Corroborando com estes resultados, vários estudos apresentam uma maior frequência de amostras resistentes quando usado a CIM se comparado com disco difusão em ágar (8,9). A identificação de amostras de enterobactérias de ambiente hospitalar “falso suscetível e falso intermediário” na técnica de disco difusão fundamentou a recomendação de submeter as amostras com estes resultados à técnica de CIM (8). A falta de correlação entre as diferentes técnicas, assim como as questões da difusão da molécula em ágar e a falta de consenso entre os comitês internacionais, dificultam os estudos e conclusões sobre resistência à colistina (8).



Também já existem evidências de diferenças entre protocolos da CIM, variando conforme a placa utilizada e a adição de surfactante (2).

Já em relação a presença do gene *mcr-1*, foi encontrado 11,27% (15/133) de salmonelas carregando o gene. Todos estes isolados apresentaram CIM de 8 µg/mL (Tabela 2) e halo entre 0 a 16 mm. Este gene foi anteriormente identificado em cinco espécies de bactérias, entre elas a *Salmonella* com disseminação em pelo menos 18 países (14) e também provenientes da suinocultura brasileira (5). Apesar deste não ser o único mecanismo que confere resistência à colistina, ele é considerado importante, uma vez que pode estar localizado em elementos móveis, tendo a capacidade de ser transferidos horizontalmente entre bactérias, tanto da mesma espécie como possivelmente entre diferentes espécies (12). A presença deste gene em isolados provenientes da suinocultura deve ser considerada um alerta, uma vez que sob a perspectiva de saúde única é importante prevenir a manutenção e distribuição de bactérias portadoras de genes de resistência no ambiente e na cadeia de produção de alimentos.

### CONCLUSÕES

O teste realizado em microdiluição em caldo foi mais sensível na detecção da resistência à colistina. Desta maneira, é possível recomendar que os isolados de *Salmonella* com resultado “suscetível e intermediário” no teste disco difusão sejam, complementarmente, testadas na CIM para orientar o tratamento de casos clínicos de campo. Além disso, observamos que isolados de *Salmonella* com alta resistência à colistina, e portadores do gene *mcr-1* estão circulando na suinocultura brasileira.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGERSØ, Y.; et al. Tentative colistin epidemiological Cutt-Off value for *Salmonella* spp. *Foodborne pathogens and disease*. v. 9, n. 4, p. 367-369, 2012.
2. ALBUR, M.; et al. Colistin susceptibility testing: time for a review. *J Antimicrob Chemotherapy*. v. 69, n. 5, p. 1432-1434, 2013.
3. BALAJI, V.; et al. Polymyxins: Antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options. *Indian J Med Microbiol*. 29:230-42, 2011.
4. BRASIL. Instrução Normativa nº 45, de 22 de Novembro de 2016. Diário Oficial da União. Seção 1, Nº 229, quarta-feira, 30 de novembro de 2016.
5. FERNANDES, M.R.; et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contributed to the global spread of the *mcr-1* gene. *EuroSurveill*. 21 (17): 30214, 2016.
6. GALES, A.C.; et al. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: a review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol* 39, 183-190, 2001.
7. LIU, Y.Y.; et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*.16(2):161-8, 2016.
8. MAALEJ, S. M. et al. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against Enterobacteriaceae. *Letters in Applied Microbiology*, v. 53, n. 5, p. 546-551, 2011.
9. MORALES, A.D.; et al. Colistin Resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Strais Isolated from Swine in Brazil. *The Cientific World Journal*. v. 2012, 2012.
10. RHOUMA, M.; et al. Colistin in pig production: Chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. *Frontiers in Microbiology*., v.7:1789, 2016.
11. SKOV, R.L.; et al. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *EuroSurveill*. 21(9):30155, 2016.
12. WEBB, H.; et al. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *The Lancet Infectious Diseases*. v. 16 n. 2. p. 144-145, 2016.
13. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Critically important antimicrobials for human medicine. 3rd rev, 2011.
14. YE, H.; et al. Diversified *mcr-1*-harbouring plasmid reservoirs confer resistance to colistin in human gut microbiota. *MBio*, v. 7, n. 2, p. e00177-16, 2016.

**Tabela 1.** Distribuição de 133 isolados de *Salmonella sp.* conforme diâmetro dos halos de inibição da colistina (10 µg) no teste de disco difusão em ágar.

	Diâmetro dos halos (mm)												
	Resistente					Intermediário			Suscetível				
	0	6	8	9	10	12	13	14	15	16	18	25	28
<b>Nº de isolados</b>	4	1	7	1	16	40	5	37	5	13	2	1	1
<b>Total</b>	29					45			59				

**Tabela 2.** Distribuição de 133 isolados de *Salmonella sp.* conforme concentração inibitória mínima (CIM) e a presença do gene *mcr-1* por PCR.

	Concentração em µg/mL de colistina					
	0,5	1	2	4	8	≥ 16
<b>Nº de isolados</b>	2	6	41	43	39	2
<b>Total</b>	49		84			

  

	Presença do gene <i>mcr-1</i>					
	0	0	0	0	15	0
<b>Nº de isolados</b>	0	0	0	0	15	0

Traço representa o ponto de corte estabelecido para considerar o isolado resistente à colistina.