

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Resistência às polimixinas: caracterização molecular (foco no gene *mcr-1*) e
avaliação de métodos de detecção

TANISE VENDRUSCOLO DALMOLIN

PORTO ALEGRE, 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Resistência às polimixinas: caracterização molecular (foco no gene *mcr-1*) e
avaliação de métodos de detecção

Tese apresentada por **Tanise Vendruscolo**
Dalmolin para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Coorientador (a): Dr^a. Daiana de Lima Morales

PORTO ALEGRE, 2018.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e aprovada em 20/12/18 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Cícero Armídio Gomes Dias

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Profa. Dra. Juliana Caierão

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Nilton Erbert Lincopan Huenuman

Universidade de São Paulo (USP)

CIP - Catalogação na Publicação

Dalmolin, Tanise Vendruscolo
Resistência às polimixinas: caracterização
molecular (foco no gene mcr-1) e avaliação de métodos
de detecção / Tanise Vendruscolo Dalmolin. -- 2018.
118 f.
Orientador: Afonso Luís Barth.

Coorientadora: Daiana de Lima Morales.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2018.

1. Resistência Bacteriana. 2. Polimixinas. 3.
mcr-1. I. Barth, Afonso Luís, orient. II. Morales,
Daiana de Lima, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O projeto recebeu financiamento do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (16-0559) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - (MCTI/CNPq). O autor recebeu bolsa de estudos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 160742/2015-3).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que nunca mediram esforços para eu realizar meus sonhos e que muitas vezes renunciaram os seus próprios sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada pela motivação, pelo apoio incondicional e pela torcida em tudo o que eu faço. Sou muito grata a vocês!

Ao meu irmão Lucas, pelo apoio e incentivo para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Ao meu namorado Fabiano Buriol, por tudo que fez e faz por mim, sempre me valorizando como pessoa. Obrigada por segurar minha mão e me passar tranquilidade nos momentos mais difíceis e de muitas dúvidas, desde o processo de seleção do doutorado. Obrigada pelo incentivo incondicional, preocupação, paciência, apoio emocional e companheirismo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Afonso Luís Barth, pela confiança em mim depositada, acreditando sempre no meu potencial. Obrigada pela orientação, dedicação, paciência, sabedoria, competência, conselhos e por todas as oportunidades que a mim foram concedidas. Tenho muito orgulho de citá-lo como um dos principais responsáveis pela minha formação profissional.

À Dra. Daiana de Lima Morales, minha coorientadora e também amiga, pela qual tenho muita admiração. Obrigada pelo apoio, aprendizado, pelas horas que passou ao meu lado me ajudando e, acima de tudo, sendo uma amiga com quem pude contar sempre. Foi um grande prazer poder trabalhar ao seu lado e aprender um pouco do mundo do sequenciamento bacteriano. Obrigada pela sua amizade!

Aos meus colegas de Laboratório de Resistência Bacteriana (LABRESIS) pelo acolhimento e convívio diário tão agradável durante estes anos. Obrigada pelos ensinamentos, pelas risadas, pelas ajudas em experimentos, pela amizade e pelos cafés (apesar de eu não gostar de café).

À aluna de iniciação científica Luiza Castro que sempre esteve lado a lado comigo no desenvolvimento de grande parte deste trabalho. Obrigada pela dedicação, disposição, paciência, persistência e por todo o esforço na execução dos experimentos.

À minha dinda Lizete, que sempre esteve aplaudindo minhas conquistas.

Às minhas amigas Naiara, Juliana, Luísa, Jaciane e Mônica pelo incentivo, pela amizade, por estarem sempre na torcida por mim e também por escutarem meus desabafos, meus medos e meus planos.

Ao PPGCF/UFRGS pela oportunidade de estudo e realização deste projeto.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e todos os funcionários do Centro de Pesquisa Experimental (CPE) por toda estrutura, equipamentos, material e local para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa.

Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida deixo aqui meu expresso agradecimento.

RESUMO

Até recentemente a resistência às polimixinas era descrita como resultado de mutações cromossômicas, porém em novembro de 2015, foi relatada a resistência plasmidial às polimixinas mediada pelo gene *mcr-1*. A técnica de referência para determinar a suscetibilidade às polimixinas é a microdiluição em caldo, porém é uma técnica laboriosa, demorada para liberação dos resultados e relativamente cara. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram investigar a presença do gene *mcr-1* em isolados de enterobactérias e estabelecer a caracterização molecular dos isolados positivos para o gene *mcr-1*, bem como avaliar diferentes metodologias para detecção da suscetibilidade às polimixinas frente a bactérias Gram-negativas. Foram avaliados 4778 isolados clínicos, obtidos entre os anos de 2013 e 2018, provenientes de um estudo de vigilância para o monitoramento de isolados com sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos. A pesquisa do gene *mcr-1* foi realizada através de PCR. Para os isolados positivos para o gene *mcr-1* foi realizada a avaliação do perfil de suscetibilidade a diversos antibióticos, e em três isolados foi avaliada a capacidade de mobilidade plasmidial, através das técnicas de conjugação e transformação, bem como a realização do sequenciamento do genoma total em equipamento Illumina MiSeq. Diferentes metodologias foram avaliadas para determinar a suscetibilidade às polimixinas. Dentre elas, o Teste Rápido NP Polimixinas, os testes comerciais Policimbac® e Ágar superpolimixinas®, bem como modificações do teste de eluição da colistina (CBDE). Dos 4778 isolados clínicos analisados, 5 (0,1%) foram positivos para o gene *mcr-1*. Dentre os cinco isolados, três eram *E. coli* (3431F, 5798F e 6699F) e dois *K. pneumoniae* (3111F e 6701F), sendo todos coprodutores de *mcr-1* e *bla*_{KPC-2}. Os cinco isolados apresentaram resistência aos antimicrobianos ertapenem, meropenem, imipenem e ciprofloxacino, sensibilidade à tigeciclina e suscetibilidade variável aos aminoglicosídeos. Frente à colistina, todos isolados apresentaram baixo nível de resistência (CIM 4µg/mL), exceto o isolado *K. pneumoniae* 6701F que foi sensível (CIM 0,25 µg/mL). Dos 3 isolados (3431F, 3111F e 5798F) submetidos à técnica de conjugação foi demonstrado que o plasmídeo contendo o gene *mcr-1* dos

isolados foi transferido por conjugação para a cepa receptora *E. coli* J53. Através do sequenciamento do genoma pode-se observar que todos os genes *mcr-1* estavam presentes em plasmídeo do grupo de incompatibilidade IncX4, sendo que *E. coli* 3431F pertencia à ST744; *E. coli* 5798F à ST457 e *K. pneumoniae* 3111F pertencia à ST437. O Teste Rápido NP Polimixinas apresentou alta sensibilidade (98%) e especificidade (98%) quando comparado ao método de referência (microdiluição em caldo), sendo que 88,7% dos isolados positivaram em menos de 2 horas. Já os testes comerciais Policimbac® e Ágar Superpolimixinas® obtiveram altos valores de sensibilidade (98% e 94,1%, respectivamente), porém com baixas especificidades, 77% para o Policimbac® e 75,4% para o Ágar Superpolimixinas®. As modificações (CBM, MPT e CSTT) do teste CBDE apresentaram bons valores de sensibilidade (95,35%, 88,37% e 93,02%, respectivamente) e especificidade (84%, 80% e 88%, respectivamente) para isolados de *Enterobacteriales*, porém o valor de Erros Muito Importantes (*Very Major Errors – VME – 4,65%* para CBM; 11,63% para MPT e 6,98% para CSTT) e Erros Importantes (*Major Errors – ME – 16%* para CBM; 20% para MPT e 12% para CSTT) foram menos satisfatórios. Para isolados não fermentadores, nenhuma das modificações foi considerada aceitável, porém cabe mencionar que o número de isolados foi pequeno para estabelecer uma conclusão final. Este estudo contribuiu para o conhecimento molecular e epidemiológico dos isolados carreadores do gene *mcr-1* no Rio Grande do Sul – Brasil, confirmando que todos os plasmídeos carreando o gene *mcr-1* descritos no Brasil pertencem ao grupo de incompatibilidade plasmidial IncX4, o que indica a alta afinidade entre essa família plasmidial e o gene *mcr-1* no país. Além disso, a descoberta de um isolado pertencente à ST437, a qual é considerada uma ST de alto risco pela elevada prevalência associada ao gene *bla_{KPC}* no Brasil é de grande preocupação. Ademais, podemos constatar que a metodologia mais adequada como triagem na detecção da resistência às polimixinas seria o Teste Rápido NP Polimixinas, o qual dentre as metodologias testadas foi a que apresentou os melhores resultados, bem como a redução no tempo de detecção da resistência observada em comparação com o teste referência.

Palavras-chave: Resistência Bacteriana. Polimixinas. *mcr-1*.

ABSTRACT

Resistance to polymyxins: molecular characterization (focus on the *mcr-1* gene) and evaluation of detection methods

Polymyxin resistance used to be related to chromosomal mutations, but in November 2015, the plasmid transferable polymyxin resistance, mediated by the *mcr-1* gene, was described. The reference method for determining susceptibility profile to polymyxins is broth microdilution (BMD), however, it is laborious, times consuming and relatively expensive. The aims of this study were to investigate the presence of *mcr-1* gene in enterobacterial isolates with reduced susceptibility to carbapenems in Rio Grande do Sul; to characterize to the molecular level the isolates harboring the *mcr-1* gene and to evaluate different polymyxins susceptibility tests against Gram-negative bacteria. We screened a total of 4,778 clinical isolates with reduced carbapenem susceptibility between 2013 and 2018 obtained in a surveillance study. The *mcr-1* gene was screened by PCR reaction. The susceptibility profile to several antibiotics was evaluated for the *mcr-1* positive isolates; three *mcr-1* positive isolates were evaluated their plasmid mobility through conjugation and transformation techniques. These three isolates were also subjected to whole genome sequencing (WGS) carried out in an Illumina MiSeq platform. Different methods were evaluated to determine susceptibility to polymyxins: the Rapid Polymyxins NP Test, the Policimbac®, Superpolymyxins® agar and the modification of the colistin broth disk elution (CBDE). Among the 4,778 clinical isolates analyzed, 5 (0.1%) were positive for the *mcr-1* gene: 3 were *E. coli* (3431F, 5798F and 6699F) and 2 *K. pneumoniae* (3111F and 6701F). These 5 isolates were co-producers of the *bla*_{KPC-2} gene. All *mcr-1* positive isolates were resistant to ertapenem, meropenem, imipenem and ciprofloxacin; susceptible to tigecycline and the susceptibility to aminoglycosides was variable. All isolates presented low level resistance to colistin (MIC 4µg/mL), except the *K. pneumoniae* 6701F which was susceptible to colistin (MIC 0.25µg/mL). The *mcr-1* carrying plasmids of the three isolates (3111F, 3431F and 5798F) were successfully transferred to *E. coli* by conjugation and analyses of the WGS of these isolates indicated that the *mcr-1* gene

was located in an IncX4-type plasmid. *E. coli* 3431F belonged to ST744, *E. coli* 5798F to ST457 and *K. pneumoniae* 3111F to ST437. The Rapid Polymyxin NP test presented high sensitivity (98%) and specificity (98%) when compared with the reference method (BMD), furthermore, for 88.7% of the isolates the results were obtained within 2 hours. The Policimbac® and Superpolymyxins® agar presented high sensitivity (98% and 94.1%, respectively) but lower specificity (77% for the Policimbac® and 75.4% for Superpolymyxins® agar). The modifications (CBM, MPT and CSTT) of the CBDE test presented a good sensitivity (95.35%, 88.37% and 93.02%, respectively) and specificity (84%, 80% and 88%, respectively) for *Enterobacteriales*, however the Very Major Errors (VME – 4.65% to CBM; 11.63% to MPT and 6.98% to CSTT) and Major Errors (ME - 16% to CBM; 20% to MPT and 12% to CSTT) were less satisfactory. None of the CBDE modifications were considered acceptable for non-fermenting isolates although only a reduced number of isolates was tested. This study showed that the prevalence of *mcr-1* gene is very low among enterobacterial isolates with reduced susceptibility to carbapenems. Moreover, it was possible to establish that the plasmids harbouring the *mcr-1* gene belong to the plasmid incompatibility group IncX4, indicating a high affinity between this plasmid and the *mcr-1* gene in the Brazil. The fact that the *K. pneumoniae mcr-1* isolate belonged to the ST437, which is considered a high risk clone associated with *bla_{KPC}* gene in Brazil is of great concern. The test with best performance to be used as screening to detect of resistance to polymyxins was the Rapid Polymyxin NP test, which also is a much faster technique in comparison to the reference method.

Keywords: Antibiotic Resistance. Polymyxins. *mcr-1*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmpC - ampicilinase

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BGN - Bacilo Gram-negativo

BMD - *Broth Microdilution*

BrCAST - *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

CA - *Categorical Agreement*

CA - MHB - Mueller Hinton Cátion Ajustado

CBDE - Eluição do Disco da Colistina (*Colistin Broth Disk Elution*)

CBM - Microeluição da Colistina (*Colistin Broth Microelution*)

CCIH - Comissão de Controle de Infecção Hospitalar

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CMS - Colistimetato sódico

CRE - *Carbapenem Resistant Enterobacterales*

CSTT - Eluição da Colistina em Tubo Teste (*Colistin Susceptibility Test Tube*)

EA - *Essential Agreement*

EDTA - *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

ERC - Enterobactérias Resistentes aos Carbapenêmicos

ESBL - *Extended Spectrum Beta-Lactamase*

FDA - *Food and Drug Administration*

GES - *Guiana-extended spectrum*

GIM - *German imipenemase*

HRM - *High-Resolution Melting*

Inc - Grupo de Incompatibilidade plasmidial

IMP - Imipenemase

IS - *Insertion Sequence*

KPC - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

LPS - lipopolissacarídeo

MBL - Metallo- β -Lactamases

MCR - *Mobile colistin resistance*

MDR - *Multi-drug resistant*

ME - Erros Importantes (*Major Errors*)

MIC - *Minimal Inhibitory Concentration*

MPT - Teste Microeluição em Placas (*Microelution-Plates Test*)

NDM - *New Delhi Metallo β -lactamase*

OMS - Organização Mundial da Saúde

OXA - Oxacilinase

PetN - Fosfoetanolamina

Pb - Pares de bases

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

P-80 - Polissorbato 80

SPM - São Paulo imipenemase

ST - *Sequence Type*

T_m - Temperatura de *melting*

VIM - Verona imipenemase

VME - Erros Muito Importantes (*Very Major Errors*)

VPN - Valor preditivo negativo

VPP - Valor preditivo positivo

WGS - *Whole Genome Sequencing*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 Resistência aos Carbapenêmicos	22
3.2 Polimixinas	25
3.2.1 Resistência às polimixinas	27
3.2.1.1 Resistência plasmidial às polimixinas – gene <i>mcr</i>	29
3.2.1.2 MCR no Brasil.....	33
3.2.1.3 Contexto genético do gene <i>mcr</i>	34
3.2.1.4 Testes fenotípicos para detecção da resistência às polimixinas.....	36
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS	40
Artigo I - Co-ocurrence of <i>mcr-1</i> and <i>bla</i> _{KPC-2} in a clinical isolate of <i>Escherichia coli</i> in Brazil.....	40
Artigo II – Acquisition of the <i>mcr-1</i> gene by a high-risk clone of KPC-2-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST437/CC258, Brazil.....	44
Artigo III – Plasmid-mediated colistin resistance: what do we know?.....	47
Artigo IV – Low prevalence of the <i>mcr-1</i> gene among carbapenemase producing clinical isolates of <i>Enterobacteriales</i>	55
Manuscrito V - Detection of <i>Enterobacteriales</i> resistant to Polymyxins using Rapid Polymyxins NP Test.....	58
Manuscrito VI – Evaluation of commercial tests for the detection of the susceptibility to polymyxins.....	66
Manuscrito VII – Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods.....	75
RESULTADOS ADICIONAIS RELACIONADOS AO PROJETO DA TESE	87
5 DISCUSSÃO GERAL	90
6 CONCLUSÕES GERAIS	98
REFERÊNCIAS	100
ANEXOS	110
Anexo – 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	110
Anexo – 2: Trabalhos publicados em colaboração não relacionados ao projeto da tese	115
Anexo – 3: Resumos publicados em congressos	116

1 INTRODUÇÃO

A resistência aos antibióticos é uma importante preocupação para a saúde da população em geral, especialmente a resistência de bactérias Gram-negativas devido à sua rápida disseminação o que limita as opções de tratamento, representando uma ameaça aos antibióticos já existentes na prática clínica (GARG et al., 2017). Bactérias Gram-negativas englobam representantes principalmente da ordem *Enterobacterales* e dos gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas*. Estas bactérias apresentam como característica em comum a parede celular, composta por uma fina camada de peptidoglicano no espaço periplasmático entre a membrana interna e a membrana externa, sendo esta última composta por fosfolipídeos e proteínas (BROWN et al., 2015).

Os carbapenêmicos são os antibióticos de escolha para o tratamento de infecções graves causadas por bacilos Gram-negativos, porém o aumento mundial da sua utilização na prática clínica gerou pressão seletiva a qual teve considerável influência na disseminação de resistência aos carbapenêmicos (GARG et al., 2017). Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista global de prioridades das principais bactérias resistentes aos antibióticos com a finalidade de orientar a pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos para esses micro-organismos. Dentre as bactérias presentes nesta lista, isolados resistentes aos carbapenêmicos da ordem *Enterobacterales* e das espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* são considerados críticos (WHO, 2017). Esses micro-organismos representam cerca de um terço das infecções hospitalares e mais de 40% em unidades de terapia intensiva, sendo infecções de difícil tratamento (THEURETZBACHER, 2017).

No entanto, o aumento da resistência aos antibióticos não é acompanhada pelo desenvolvimento de novos antibióticos eficazes, exigindo, muitas vezes, a reintrodução de antibióticos antigos que foram abandonados na prática clínica, principalmente devido aos seus efeitos adversos. As polimixinas foram reintroduzidas no uso clínico como valiosas opções terapêuticas, através de novas formulações e

regimes de dosagem que reduziram consideravelmente a toxicidade anteriormente atribuída a essa classe de antimicrobianos. Atualmente as polimixinas são consideradas a última opção de tratamento contra organismos multirresistentes, particularmente para bactérias produtoras de carbapenemases (MOLINA et al., 2009; SKOV et al., 2016).

Contudo, a resistência às polimixinas vem aumentando mundialmente, possivelmente devido ao aumento do uso na prática clínica. Antes de 2015, os mecanismos de resistência às polimixinas eram associados apenas a mutações cromossômicas, as quais acarretam modificação do lipídeo A do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, o qual é o alvo primário das polimixinas. Em 2015, Liu e colaboradores descreveram pela primeira vez a resistência às polimixinas mediada por um gene *mcr-1* com localização plasmidial em isolados de origem humana e animal na China. Essa resistência plasmidial causou grande preocupação mundial devido à possibilidade de transferência horizontal e, portanto, elevada disseminação. Após sua primeira descrição, o gene *mcr-1* e seus variantes foram relatados em diversos países e a presença desse gene foi observada em diversas espécies bacterianas de diferentes origens (BARON et al., 2016; LIU et al., 2016).

Devido à situação atual do aumento da resistência às polimixinas, a detecção de isolados resistentes a estes antibióticos torna-se cada vez mais crucial para o correto tratamento. Essa detecção exige que os métodos sejam confiáveis, baratos, rápidos e de fácil execução. Atualmente o teste de referência para avaliar a suscetibilidade de isolados frente às polimixinas é o teste de microdiluição em caldo, porém é considerado um teste difícil de ser realizado em laboratórios de rotina devido aos altos custos e tempo para execução. Portanto, diversos testes têm sido relatados como alternativas ao teste de referência como o Teste Rápido NP Polimixinas (NORDMANN et al., 2016a), Policimbac® (PROBAC, 2018), Ágar Superpolimixinas (NORDMANN et al., 2016b), eluição da colistina (SIMNER et al., 2018), entre outros.

Considerando que isolados bacterianos produtores de MCR, tanto de origem animal como de origem humana, já foram relatados em diversos estados do Brasil e tendo em vista a importância das polimixinas no tratamento de infecções causadas por

micro-organismos multirresistentes, o levantamento epidemiológico e a caracterização de isolados produtores de MCR são de grande importância. Além disso, a avaliação de métodos que acarretem na detecção confiável e precoce de isolados resistentes às polimixinas é imprescindível para um adequado e rápido manejo do paciente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a presença do gene *mcr-1* em isolados de *Enterobacterales* e estabelecer a caracterização molecular dos isolados positivos para o gene *mcr-1*, bem como avaliar diferentes testes para detecção da resistência às polimixinas frente a bactérias Gram-negativas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a presença do gene *mcr-1* em isolados clínicos de *Enterobacterales*;
2. Caracterizar os isolados portadores do gene *mcr-1* de acordo com o perfil de suscetibilidade;
3. Avaliar a capacidade de transferência (conjugação/transformação) de plasmídeos carreadores do gene *mcr-1*;
4. Avaliar por sequenciamento de nova geração o genoma completo dos isolados produtores do gene *mcr-1*;
5. Avaliar o desempenho do teste fenotípico Rápido NP Polimixinas na detecção de resistência às polimixinas em bactérias Gram-negativas;
6. Avaliar os testes comerciais Superpolimixinas® ágar e Policimbac® frente a isolados resistentes e sensíveis as polimixinas;
7. Avaliar o teste de microeluição da colistina e propor modificações no teste.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A resistência aos antimicrobianos é considerada um grave problema de saúde pública em âmbito mundial, dificultando o tratamento de infecções causadas por micro-organismos resistentes. O desenvolvimento da resistência bacteriana é um processo evolutivo normal, porém, é acelerado pela pressão seletiva exercida pelo uso de antibacterianos. O impacto do aumento da resistência ocorre em todos os grupos etários, tornando o tratamento difícil e com altos custos para a sociedade, tanto em questões humanas como econômicas, resultando em doenças prolongadas e aumento da mortalidade (LOOKE et al., 2013; WHO 2014).

3.1 Resistência aos Carbapenêmicos

Para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas, geralmente, utiliza-se como agentes de primeira linha antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, em especial cefalosporinas de amplo espectro (3ª e 4ª geração). No entanto, tem sido demonstrado o aumento da resistência a esses antibióticos devido à produção de enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL), as quais conferem resistência à maioria dos β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas de 3ª e 4ª geração e monobactâmicos, porém mantendo-se sensíveis aos carbapenêmicos, cefamicinas e também aos inibidores de β -lactamases, como clavulanato e tazobactam (ADLER et al., 2016; LUPO et al., 2013; TSAI et al.; 2011).

Com o aumento da proporção de cepas com resistência mediada por ESBL, os carbapenêmicos tornaram-se os antimicrobianos de escolha para o tratamento de infecções graves causadas por Bacilos Gram-negativos (BGN). Porém, seguindo-se ao crescente uso de carbapenêmicos, novos mecanismos de resistência a esta classe de antimicrobianos foram surgindo. Os mecanismos envolvidos na resistência podem ser: modificação na permeabilidade da membrana externa (perda de porinas e expressão de bombas de efluxo) em combinação com a produção de ESBL ou AmpC e produção de β -lactamases que hidrolisam os carbapenêmicos, as carbapenemases (HAIDER et al., 2014; NORDMANN et al., 2009; NORDMANN et al., 2012a).

O principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em BGN, do ponto de vista clínico, microbiológico e de saúde pública é a produção de carbapenemases, sendo reportadas e disseminadas mundialmente, conferindo resistência à maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos. Os genes codificadores de carbapenemases estão normalmente localizados em elemento genético móvel, como um plasmídeo, facilitando a transferência da resistência e a disseminação entre os pacientes (QUEENAN; BUSH, 2007; NORDMANN et al., 2009; NORDMANN et al., 2012a; MOELLERING, 2010).

As enzimas β -lactamases podem ser divididas conforme as classificações de Ambler ou por Bush-Jacoby-Medeiros. A classificação de Ambler é a mais simples, agrupando essas enzimas em quatro classes moleculares (A, B, C e D), levando em consideração a estrutura primária das enzimas. As classes A, C e D são formadas por enzimas que possuem o aminoácido serina no seu sítio ativo e a classe B são as metaloenzimas que contém um ou dois íons zinco no sítio ativo (BUSH; JACOBY, 2010).

A classificação por Bush-Jacoby-Medeiros agrupa as enzimas conforme sua característica funcional relacionando sua estrutura com o espectro de antimicrobianos hidrolisados e ação dos inibidores de β -lactamases. Essa classificação é mais subjetiva, e muitas β -lactamases têm sido descritas apenas com base na sua sequência proteica, com pouca descrição funcional, dificultando a utilização dessa classificação (BUSH; JACOBY, 2010).

As carbapenemases da classe A de Ambler (Grupo 2f de Bush & Jacoby) são muito eficientes na hidrólise de benzilpenicilina e ampicilina e, conseqüentemente, elas foram caracterizadas inicialmente como penicilinasas. As enzimas mais comuns da classe A de Ambler são *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) e *Guiana-extended spectrum* (GES), que são codificadas por plasmídeos (NORDMANN et al., 2011; WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY et al., 2007). A KPC é a enzima clinicamente mais importante dessa classe em enterobactérias e, atualmente, encontra-se amplamente disseminada no mundo, sendo a variante KPC-2 mais comumente identificada (NORDMANN; POIREL, 2014; RIBEIRO et al., 2012).

As enzimas da classe B de Ambler (grupo 3 de Bush & Jacoby) são metalo- β -lactamases (MBLs), as quais hidrolisam todos os β -lactâmicos e são inibidas pela ação de quelantes, como o ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA) (QUEENAN; BUSH, 2007). As enzimas mais comumente encontradas em enterobactérias são Imipenemase (IMP), Verona imipenemase (VIM) e New Delhi metalo β -lactamase (NDM) ao passo que as outras enzimas como German imipenemase (GIM) e São Paulo imipenemase (SPM) têm sido relatadas esporadicamente (NORDMANN; POIREL, 2014).

A classe D de Ambler inclui as oxacilinasas – OXAs (grupo 2d de Bush & Jacoby), principalmente identificadas nas enterobactérias *K. pneumoniae* e *E. coli*. (*bla*_{OXA-48} like) e em *A. baumannii* (*bla*_{OXA-23}), as quais são caracterizadas por apresentar baixa atividade hidrolítica frente aos carbapenêmicos. A prevalência real dessa classe de enzimas pode ser subestimada, devido a grande dificuldade na sua identificação *in vitro* (NORDMANN et al., 2011).

Existem diversos métodos fenotípicos disponíveis para detecção das carbapenemases, entretanto, o padrão de referência para identificação e diferenciação de carbapenemases se baseia em técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que fornece resultados dentro de 4-6 horas, com excelente sensibilidade e especificidade. Essa metodologia pode ser seguida por sequenciamento se necessária identificação precisa da carbapenemase (NORDMANN et al., 2011; NORDMANN et al., 2012b).

A técnica de PCR em tempo real também permite realizar ensaios multiplex, fornecendo resultados ainda mais rápidos que a PCR convencional, com excelente sensibilidade e especificidade. A PCR em tempo real analisada pela técnica de *High Resolution Melting* (HRM) realiza a análise de fragmentos de DNA amplificados, através da relação entre temperatura e extensão da desnaturação do fragmento amplificado. Realiza-se a determinação da *temperatura de melting* (T_m), que é a temperatura em que 50% da dupla fita do DNA se dissocia tornando-se fita simples. A T_m é correlacionada com o tamanho do fragmento e com o conteúdo de GC da dupla fita. Essa determinação é possível pela utilização de um corante fluorescente que se intercala no DNA dupla fita emitindo fluorescência que é detectada pelo equipamento

e demonstrada em tempo real em forma de gráficos com picos na T_m determinada. As vantagens da tecnologia HRM são baixo custo, elevada sensibilidade permitindo a detecção de fragmentos com apenas $0,1^\circ\text{C}$ de diferença na T_m e simplicidade na realização (TONG; GIFFARD, 2012).

3.2 Polimixinas

As polimixinas são consideradas as últimas alternativas terapêuticas para tratamento de infecções causadas por BGN resistentes aos carbapenêmicos. A colistina (polimixina E) e a polimixina B são antibióticos polipeptídeos catiônicos pertencentes à classe das polimixinas. A estrutura básica das polimixinas consiste em uma cadeia lateral de ácido graxo unido a um anel peptídico policatiônico composto por 8-10 aminoácidos. Polimixina B e colistina diferem apenas por um aminoácido no anel peptídico, com o aminoácido fenilalanina em polimixina B e o aminoácido leucina em colistina (SADER et al., 2015) (Figura 1).

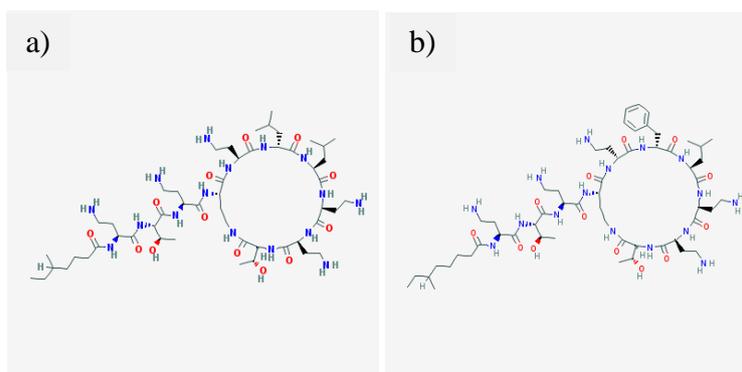


Figura 1. Estrutura química da colistina (a) e da polimixina B (b).
Fonte: PubChem. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

A administração dos dois antibióticos difere, sendo a polimixina B administrada diretamente como um antibiótico ativo, enquanto a colistina é administrada como um pró-fármaco inativo, denominado metanossulfonato de colistina (também conhecida como colistimetato sódico - CMS). O pró-fármaco colistimetato sódico é menos tóxico do que o fármaco ativo (sulfato de colistina), e é convertido em meio aquoso, e *in vivo* em fluidos biológicos, para sulfato de colistina e vários compostos metanossulfonados inativos (POIREL et al., 2017a).

A colistina apresenta estreita janela terapêutica e os principais efeitos adversos relacionados ao seu uso parenteral são neurotoxicidade e nefrotoxicidade. A neurotoxicidade é dose dependente e pode ser reversível, podendo causar parestesia periférica e facial, fraqueza, tonturas, distúrbios visuais, confusão, ataxia e bloqueio neuromuscular, e até levar a insuficiência respiratória ou apneia. A nefrotoxicidade também é dose dependente e apresenta como fatores de risco a coadministração de outras drogas nefrotóxicas (anti-inflamatórios, antibióticos como a vancomicina e aminoglicosídeos) e fatores relacionados ao paciente (idade, sexo masculino, hipoalbuminemia e hiperbilirrubinemia). A nefrotoxicidade apresenta início rápido, com a maioria dos casos ocorrendo na primeira semana de tratamento. Considerando que a polimixina B não é administrada como um pró-fármaco, é mais rápido atingir a concentração plasmática desejada no sangue e apresenta menores níveis de nefrotoxicidade do que a colistina (POIREL et al., 2017a).

A colistina foi descoberta em 1947 a partir de uma bactéria do solo denominada *Paenibacillus polymyxa* subsp. *colistinus* (BENEDICT; LANGLYKKE, 1947) tendo sua aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) - EUA em 1959. Tanto o sulfato de colistina, como seu pró-fármaco (CMS) foram amplamente utilizados por décadas para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas. Porém, devido a sua nefrotoxicidade, na década de 1970, o uso clínico das polimixinas foi reduzido, sendo substituídos por antimicrobianos mais ativos e menos tóxicos, como aminoglicosídeos, quinolonas e beta-lactâmicos. Por aproximadamente 20 anos, a utilização da colistina foi restrita a usos oftálmicos e tópicos e também ao uso sistêmico ou nebulizado para pacientes com fibrose cística, bem como na descontaminação do trato digestivo e orofaringe. No entanto, com a crescente prevalência de bactérias Gram-negativas multirresistentes, as polimixinas foram reintroduzidas para uso clínico como valiosas opções terapêuticas. Considerando a escassez de antibióticos novos, as polimixinas são atualmente um dos únicos antibióticos efetivos contra organismos multirresistentes, particularmente para bactérias produtoras de carbapenemases (POIREL et al., 2017a; SKOV et al., 2016).

Ao contrário da utilização na medicina humana, na medicina veterinária a colistina foi utilizada extensivamente, e sem interrupção, por décadas para o tratamento e prevenção de doenças infecciosas causadas por enterobactérias em aves e porcos e, também, utilizada como promotor de crescimento (IRRGANG et al., 2016; POIREL et al., 2017a; SKOV et al., 2016). Em novembro de 2016, foi publicada uma Instrução Normativa que proíbe, em todo o Brasil, a importação e a fabricação do sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. Essa proibição foi baseada nas recomendações da OMS devido ao possível impacto na saúde humana, sendo que outros países também decidiram banir a colistina como promotor de crescimento. A colistina continua a ser utilizada normalmente para o tratamento de enfermidades nos animais como produto de uso veterinário (BRASIL, 2016; WALSH; WU et al., 2016).

O mecanismo de ação das polimixinas é através da interação com os LPS e fosfolipídios da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas. Elas desestabilizam o LPS através da troca de cátions (Ca^{+2} e Mg^{+2}), aumentando a permeabilidade da membrana bacteriana, levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático e, finalmente, causando morte bacteriana. Apesar de o LPS ser o alvo inicial, o modo exato de ação das polimixinas ainda não está claro. Outros possíveis mecanismos de ação das polimixinas são o efeito de endotoxina e a inibição de enzimas vitais da respiração, como NADH-quinona oxidoreductase tipo II [NDH-2]. Durante a lise celular, moléculas de endotoxinas são liberadas e as polimixinas têm a capacidade de ligar-se e neutralizar (POIREL et al., 2017a; ZAVASCKI et al., 2007).

3.2.1 Resistência às polimixinas

As polimixinas são ativas contra a maioria dos membros da ordem *Enterobacterales* e apresentam uma atividade significativa contra bactérias Gram-negativas não fermentadoras, como *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Algumas espécies de BGN são naturalmente resistentes às polimixinas, incluindo *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas mallei*, *Burkholderia mallei*, *Chromobacterium* spp., *Edwardsiella* spp., *Brucella* spp.,

Legionella spp., *Campylobacter* spp. e *Vibrio cholerae*. As polimixinas são inativas contra cocos Gram-negativos, bactérias Gram-positivas e bactérias anaeróbias (POIREL et al., 2017a; SADER et al., 2015). Acredita-se que o mecanismo de resistência intrínseca às polimixinas seja promovido pela expressão de genes constitutivos que adicionam moléculas catiônicas ao LPS bacteriano, levando a diminuição da afinidade das polimixinas em seu local de ação. Enquanto nas bactérias Gram-positivas a explicação é a falta de membrana celular externa contendo LPS, sendo que a polimixina não consegue se ligar e agir, promovendo a resistência bacteriana (SRINIVAS; RIVARD, 2017).

Através de programas de vigilância global, a resistência às polimixinas em *Enterobacteriales* (excluindo espécies com resistência intrínseca) é em torno de 0,67-1,6%, com taxas menores em *E. coli* (0,2-0,6%), taxas moderadas em *K. pneumoniae* (1,5-6,8%) e taxas muito mais altas em *Enterobacter* spp. (13,9-20,1%). Considerando outros mecanismos de resistência associados à resistência às polimixinas, como ESBLs, a porcentagem é de 2,3-5,5% para *Enterobacteriales* (>11,5% são *K. pneumoniae*); 4,5-16,3% para *Enterobacteriales* resistentes aos carbapenêmicos e 6,2-12,0% para *Enterobacteriales* (14-36,6% são *K. pneumoniae*) produtoras de carbapenemase (SHERRY; HOWDEN, 2018).

Até 2015 acreditava-se que os únicos mecanismos de resistência às polimixinas eram mediados por mutações cromossômicas. Essas modificações cromossômicas levam à modificação do lipídeo A (componente do LPS bacteriano) através de substituições catiônicas, diminuindo a afinidade das polimixinas, similarmente ao que é observado no mecanismo de resistência intrínseca às polimixinas. Diversos genes e operons estão envolvidos na modificação do lipídeo A: (i) mutações nos genes responsáveis pela síntese dos grupos catiônicos e sua adição ao LPS (*pmrC*, *pmrE* e *pmrHFIJKLM*); (ii) mutações nos genes reguladores que codificam proteínas envolvidas no sistema PmrAB em *K. pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes* e *Salmonella enterica* (genes *pmrA* e *pmrB*) e no sistema PhoPQ em *K. pneumoniae* e *E. coli* (genes *phoP* e *phoQ*) e (iii) mutações nos genes reguladores como *mgrB* em *Klebsiella* spp., o qual regula o

sistema PhoPQ e operon *crrAB* em *K. pneumoniae*, o qual regula o sistema PmrAB (YE et al., 2016).

3.2.1.1 Resistência plasmidial às polimixinas – gene *mcr*

Em novembro de 2015, Liu e colaboradores reportaram, pela primeira vez, o gene denominado *mobile colistin resistance (mcr-1)* que confere resistência à colistina e é mediado por plasmídeos, em isolados bacterianos de animais e humanos de *E. coli* e *K. pneumoniae* provenientes da China. Esta descoberta mudou o cenário de resistência às polimixinas, devido à possibilidade de transferência horizontal desse gene, tornando-se uma grande preocupação para a saúde pública. MCR-1 é uma enzima da família das fosfoetanolaminas transferases e sua aquisição promove a adição de fosfoetanolamina (PEtN) ao lipídeo A, similarmente ao que ocorre nas mutações cromossômicas, resultando na redução da afinidade às polimixinas e resistência (LIU et al., 2016).

Após a sua primeira descrição, o gene *mcr-1* foi relatado em diversas regiões do mundo, incluindo países do continente asiático, africano, europeu, americano e da Oceania (ELLEM et al., 2017; IRRGANG et al., 2016; PRIM et al., 2016; YE et al., 2016). O relato mais antigo do gene *mcr-1* é datado nos anos 1980 identificado em uma amostra oriunda de galinha na China. Em seres humanos, o isolado mais antigo foi datado em 2008, no Vietnã. Estes achados indicam que o gene *mcr-1* tem estado presente em isolados coletados no passado, porém ainda não tinha sido descoberto (SKOV et al., 2016).

O gene *mcr-1* vem sendo relatado em espécies de enterobactérias, em sua maioria em isolados de *E. coli*. A ocorrência em *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp. e *Enterobacter* spp. também já foi reportada, porém de maneira esporádica, sugerindo a ocorrência da transferência interespecie desse gene (IRRGANG et al., 2016; YE et al., 2016).

O gene *mcr* tem sido encontrado em bactérias isoladas a partir de diversas origens. Dentre elas podemos citar os seres humanos e animais como galinhas, porcos e gado. Estes animais têm sido considerados reservatórios de *E. coli* carregando o gene

mcr-1. Nos seres humanos já foram identificadas enterobactérias portadoras do gene *mcr-1* oriundas de pacientes com infecções, bem como assintomáticos, incluindo viajantes internacionais. A possível disseminação desse gene de bactérias de origem animal para bactérias de origem humana é uma séria preocupação principalmente em enterobactérias produtoras de carbapenemases (IRRGANG et al., 2016; SKOV et al., 2016; YE et al., 2016).

Muitos isolados produtores de *mcr-1* exibem baixo nível de resistência frente às polimixinas (Concentração Inibitória Mínima [CIM] 4µg/mL), sendo que já foram descritos casos de isolados portadores desse gene e sensíveis às polimixinas, contribuindo, muitas vezes, para uma disseminação silenciosa, visto que a pesquisa desse gene é normalmente realizada em isolados resistentes às polimixinas (FERNANDES et al., 2016a). No estado do Rio Grande do Sul, o gene *mcr-1* foi detectado em 10 isolados de *E. coli* provenientes de aves. Os isolados apresentaram valores de CIM de 0,25-2,0µg/mL, sendo considerados sensíveis segundo o BrCAST (*Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Surpreendentemente, estes isolados são provenientes de aves não expostas à polimixina durante sua vida, de acordo com relatórios oficiais do uso de antibióticos (LENTZ et al., 2016). Porém, de acordo com Fernandes e colaboradores, o possível uso de colistina ao longo da cadeia de produção destas aves, não pode ser descartado (FERNANDES et al., 2016b).

Até o momento (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> – 28 de outubro de 2018) são conhecidas 8 variantes do *mcr*: *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7* e *mcr-8* (Tabela 1). Através do GenBank sabe-se que o gene *mcr-1* apresenta pelo menos 13 variantes, encontrados em diversos países, que diferem do *mcr-1* por apenas um nucleotídeo. *mcr-1.2* (*K. pneumoniae* na Itália) (DI PILATO et al., 2016), *mcr-1.3* (*E. coli* na China) (YANG et al., 2017), *mcr-1.4* (*E. coli* na China), *mcr-1.5* (*E. coli* na Argentina), *mcr-1.6* (*Salmonella typhimurium* na China) (LU et al., 2017), *mcr-1.7* (*E. coli* na China), *mcr-1.8* (*E. coli* em Brunei) (TIJET et al., 2017), *mcr-1.9* (*E. coli* na China) (LIU et al., 2018), *mcr-1.10* (*Moraxella* spp. na Grã-Bretanha) (ABUOUN et al., 2017), *mcr-1.11* (KY853650.1), *mcr-1.12* (LC337668.1) e *mcr-1.13* (*E. coli* na Itália) (ALBA et al., 2018).

Em junho de 2016 foi relatada na Bélgica a existência do gene *mcr-2* em amostras de porcos e novilhos de *E. coli* resistentes à colistina e que não apresentavam o gene *mcr-1*. Essa variante apresenta 1617 pares de bases (pb), sendo 9 pb menor que *mcr-1* (1626 pb) e possui 76,75% de identidade em nível de nucleotídeo com o gene *mcr-1* (XAVIER et al., 2016).

A descoberta do gene *mcr-3* foi relatada em junho de 2017 em isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Salmonella* spp. na Ásia e EUA. O gene *mcr-3* apresentou 45% e 47% de identidade em nível de nucleotídeo com *mcr-1* e *mcr-2*, respectivamente. MCR-3 também mostrou 94,1% a 94,8% de identidade em nível de aminoácido com proteínas encontradas em 3 espécies de *Aeromonas* spp. Além disso, um elemento de transposon truncado, TnAs2, que foi caracterizado apenas em *Aeromonas salmonicida*, foi localizado a montante do gene *mcr-3*. Estes resultados sugerem que o gene *mcr-3* em enterobactérias pode ter sua origem em espécies de *Aeromonas* (YIN et al., 2017).

A proteína MCR-3 tem apenas 32,5%, 31,7%, 49,0% e 34,7% de identidade em nível de aminoácido com as proteínas MCR-1, MCR-2, MCR-4 e MCR-5, respectivamente, sugerindo que não é uma variante recentemente evoluída do MCR-1, mas sim que possa ser uma classe distinta de enzima (LIU et al., 2017).

O MCR-4 foi descrito em agosto de 2017 em amostra de *S. enterica* oriunda de um porco no abate na Itália em 2013, e em cepas de *E. coli* coletadas durante o diagnóstico rotineiro da diarreia pós-desmame em porcos da Espanha e da Bélgica em 2015 e 2016. Esse gene está inserido em um plasmídeo pequeno, não auto-conjugativo, necessitando para sua mobilização um plasmídeo auxiliar, que promove a conjugação (CARATTOLLI et al., 2017).

O gene *mcr-5* foi encontrado na Alemanha durante os anos de 2011 a 2013, oriundo de isolados de *S. enterica subsp. enterica* serovar Paratyphi B (BOROWIAK et al., 2017).

Tabela 1. Variantes do gene *mcr* disponíveis no banco de dados do *GenBank* (atualizado em 28 de outubro de 2018 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Gene	País	Origem	Espécie	Referência	Variantes
<i>mcr-1</i>	China	Carne de frango e porco e paciente internado ^a	<i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i>	Liu et al., 2016	<i>mcr-1.2</i> – <i>mcr-1.13</i>
<i>mcr-2</i>	Bélgica	Porco e gado	<i>E. coli</i>	Xavier et al., 2016	<i>mcr-2.2</i>
<i>mcr-3</i>	China	Porco	<i>E. coli</i>	Yin et al., 2017	<i>mcr-3.2</i> – <i>mcr-3.12</i>
<i>mcr-4</i>	Itália, Espanha e Bélgica	Porco	<i>Salmonella enterica</i> e <i>E. coli</i>	Carattoli et al., 2017	<i>mcr-4.2</i>
<i>mcr-5</i>	Alemanha	Porco	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi B	Borowiak et al., 2017	<i>mcr-5.3</i>
<i>mcr-6</i> ^b	Grã-Bretanha	Porco	<i>Moraxella</i> sp.	AbuOun et al., 2017	-
<i>mcr-7</i>	China	Frango	<i>K. pneumoniae</i>	Yang et al., 2018	-
<i>mcr-8</i>	China	Porco, frango e paciente internado.	<i>K. pneumoniae</i>	Wang, X. et al., 2018	

^aApós sua primeira publicação, por Liu e colaboradores, o gene *mcr-1* foi isolados de diversas origens.

^b*mcr-2.2* (1617 bp) foi renomeado como *mcr-6*.

A coocorrência de diferentes genes de resistência a diferentes classes de antibióticos tem sido relatada em diversas espécies bacterianas. A presença do gene *mcr-1* tem sido associado com ESBL, tipo CTX-M, SHV e TEM, e/ou cefalosporinase AmpC, como CMY. Também foi descrita a coocorrência associada com gene de resistência para quinolonas (*qnrS* e *aac(6′)-Ib-cr*) e carbapenemases (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}* e *bla_{VIM}*). A coexistência do gene *mcr-1* em um isolado produtor de carbapenemase, é de grande preocupação, visto que as polimixinas seriam as opções de tratamento de uma infecção causada por um micro-organismo produtor de carbapenemase (DELGADO-BLAS et al., 2016; FALGENHAUER et al., 2016; FERNANDES et al., 2016a; HASMAN et al., 2015, MULVEY et al., 2016; RAPOPORT et al., 2016; SKOV et al., 2016).

Na literatura há relatos da presença do gene *mcr-1* em isolados produtores de NDM, em particular isolados de *E. coli* de origem animal e humana (BULMAN et al., 2017; LI et al., 2018; WANG, R. et al., 2018), bem como em isolado de origem animal de *Cronobacter sakazakii* (LIU et al., 2017) e isolado de *K. pneumoniae*, também de origem animal (DU et al., 2016). Além disso, a coocorrência de OXA-48 e *mcr-1* (MULVEY et al., 2016) e VIM e *mcr-1* (POIREL et al., 2016), ambos de isolados oriundos do ser humano, tem sido relatado na literatura. Também existem alguns relatos da coocorrência de KPC e do gene *mcr-1*, em particular em isolados de *E. coli* (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2017; DALMOLIN et al., 2017; FALGENHAUER et al., 2016; TACAO et al., 2017; ZHAO et al., 2018) e menos frequentemente em isolados de *K. pneumoniae* (AIRES et al., 2017; DALMOLIN et al., 2018a; DI PILATO et al., 2016).

3.2.1.2 MCR no Brasil

No Brasil, o gene *mcr-1* foi primeiramente detectado em isolados de *E. coli* provenientes de animais de produção no sul (estados de Santa Catarina e Paraná) e sudeste (estados de São Paulo e Minas Gerais) do país. A maioria dos isolados apresentou coocorrência de ESBL do tipo CTX-M (FERNANDES et al., 2016a). Em seres humanos, o primeiro caso de *E. coli* apresentando o gene *mcr-1* ocorreu no estado do Rio Grande do Norte (FERNANDES et al., 2016c). Após essas descobertas, diversos relatos no Brasil foram publicados.

No estado de São Paulo foram relatadas treze amostras positivas para o gene *mcr-1* oriundas de pinguins migratórios (SELLERA et al., 2017), 8 isolados de *E. coli* provenientes de amostras de carne de frango (MONTE et al., 2017; MORENO et al., 2018), além de 3 isolados de *E. coli* oriundas de praias públicas (FERNANDES et al., 2017). Na região nordeste foi relatado uma amostra de *E. coli* positiva para o gene *mcr-1* proveniente de gado saudável (PALMEIRA et al., 2018), bem como *E. coli* positiva para o gene *mcr-1* proveniente de mangue poluído (SACRAMENTO et al., 2018). No estado do Rio Grande do Sul foram relatados 10 isolados de *E. coli* provenientes de aves (LENTZ et al., 2016) e 1 isolado de *S. enterica serovar*

Typhimurium oriunda de carne de porco congelada (RAU et al., 2018) positivos para o gene *mcr-1*.

Em seres humanos sabe-se da existência de amostras positivas para o gene *mcr-1* no estado de Pernambuco (ROCHA et al., 2017), Espírito Santos (AIRES et al., 2017; TONINI et al., 2018), Rio de Janeiro (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2017), São Paulo (OLIVEIRA et al., 2018; ROSSI et al., 2017), Paraná (PILONETTO et al., 2018) e Rio Grande do Sul (DALMOLIN et al., 2017; DALMOLIN et al., 2018a; DALMOLIN et al., 2018b; LORENZONI et al., 2018).

3.2.1.3 Contexto genético do gene *mcr*

O primeiro plasmídeo carreador do gene *mcr-1* descrito pertence ao grupo de plasmídeos IncI2 (LIU et al., 2016). Estudos posteriores indicaram que o gene *mcr-1* não é restrito apenas a esse grupo plasmidial, sendo encontrado, também em IncX4, IncHI2, IncF, IncHI1, IncP, IncY, IncFI e IncFIB (HASMAN et al., 2015; POIREL et al., 2017b). Estes grupos de plasmídeos têm sido implicados na disseminação global de outros genes de resistência em espécies de enterobactérias, provenientes tanto de origem humana como de animal (CAMPOS et al., 2016; TSE; YUEN, 2016). A disseminação do gene *mcr-1* não está associada a uma linhagem clonal específica e nem a um grupo de plasmídeos específico, sendo que esta ampla flexibilidade molecular facilitaria muito sua disseminação (ZURFLUH et al., 2017).

A coexistência de dois plasmídeos diferentes com o gene *mcr* no mesmo isolado bacteriano já foi relatada e é bastante intrigante. Conforme análise dos transconjugantes foi sugerida que a coexistência de dois plasmídeos com o gene *mcr* não proporciona um efeito aditivo significativo nos valores de CIM e os isolados encontrados são capazes de adquirir e manter múltiplos plasmídeos de resistência sem perda aparente de aptidão em relação à capacidade de êxito na colonização e também em causar infecções clínicas em pacientes (LIU et al., 2017; ZURFLUH et al., 2017).

Frequentemente, o gene *mcr* é identificado em associação com a sequência de inserção IS*AplI* na extremidade 5', sendo que essa sequência, seguida pelo gene *nikB* seria o componente chave na mobilização do gene *mcr*. IS*AplI* pertence a família IS30

e foi primeiramente identificada em *Actinobacillus pleuropneumoniae*, um bacilo Gram-negativo da família de *Pasteurellaceae*, sendo causador de pleuropneumonia necrótica em porcos (FALGENHAUER et al., 2016; PETRILLO et al., 2016; POIREL et al., 2017b).

Sugere-se que o gene *mcr-1* tenha sido inicialmente mobilizado por duas cópias de *ISAp11* de um progenitor desconhecido, que ao longo da evolução, este transposon possa ter perdido uma ou ambas as cópias de *ISAp11*, visto que é característica dos membros da família *IS30* perder uma cópia da IS por transposição ou por eventos de recombinação ilegítimos. Isto ocasiona um aumento na estabilidade do vetor plasmidial *mcr-1* e facilita a disseminação generalizada deste gene. Em algumas circunstâncias o gene *mcr-1* pode ser mobilizado por uma única cópia *upstream* em conjunto com sequências incompletas de uma *ISAp11* a *downstream*. *ISAp11* permite a aquisição de *mcr-1* em vários tipos de plasmídeos, sendo que estes elementos móveis são altamente ativos e presentes em múltiplas cópias no genoma. Esses locais de inserção são notáveis por seu alto conteúdo AT (POIREL et al., 2017b; SNESRUD et al., 2016; SNESRUD et al., 2017; ZURFLUH et al., 2017).

Existem alguns indícios de que o gene *mcr* tenha origem em isolados provenientes de animais. A primeira evidência seria o fato do gene *mcr-1* ser frequentemente associado à sequência de inserção *ISAp11*, sendo que essa IS foi originalmente identificada em espécie bacteriana amplamente encontrada em suínos. Outra evidência seria a presença de coprodutores de resistência para antibióticos específicos de uso veterinário, como o gene *florR*, que codifica resistência ao florfenicol. E por fim, a evidência da ampla disseminação do gene *mcr-1* em isolados de *E. coli* de origem animal (KIEFFER et al., 2017).

O gênero *Moraxella* spp. foi identificado como potencial reservatório de genes similares ao *mcr* que poderiam ser mobilizados a partir de seu hospedeiro original para se tornarem resistentes em espécies clinicamente significativas. Os genes *mcr-1* e *mcr-2* apresentam considerável grau de similaridade com alguns genes cromossômicos intrínsecos das espécies de *Moraxella*. As espécies exatas que deram origem aos genes *mcr-1* e *mcr-2* permanecem a serem determinadas. Especula-se que a espécie

relacionada com o gene *mcr-1* seria *M. porci*, enquanto que a espécie mais intimamente relacionada ao gene *mcr-2* seria *M. osloensis* (KIEFFER et al., 2017; POIREL et al., 2017b).

3.2.1.4 Testes fenotípicos para detecção da resistência às polimixinas

Com o aumento do uso das polimixinas, bem como a sua resistência, o desenvolvimento de métodos rápidos e confiáveis para a determinação da suscetibilidade de isolados frente a esses antimicrobianos se faz necessário. A avaliação da suscetibilidade *in vitro* é repleta de complicações, devido principalmente às propriedades catiônicas, baixa difusão das polimixinas em ágar e a ocorrência de heterorresistência às polimixinas em muitas espécies (NORDMANN et al., 2016b; POIREL et al., 2017b).

Os testes de disco difusão ou fita de gradiente (Etest, M.I.C.E., etc.) não são recomendados, visto que a difusão das polimixinas em ágar é lenta e irregular (LOTEM-FOE et al., 2007). Devido a esses problemas, a microdiluição em caldo para determinar a CIM é o teste de referência para avaliar a suscetibilidade das polimixinas. A microdiluição em caldo é uma técnica que apresenta elevada reprodutibilidade, confiabilidade e possibilidade de automação. Alguns cuidados com esse teste frente às polimixinas devem ser tomados. No entanto, a técnica é bastante laboriosa e a preparação manual de soluções de antibióticos podem levar a erros significativos. É importante considerar que na técnica de microdiluição deve-se utilizar o meio de cultura Mueller Hinton cátion ajustado, bem como o sulfato de colistina, e não seu pró-fármaco, pois este produz valores de CIM errôneos (POIREL et al., 2017a).

Devido às suas propriedades catiônicas, as polimixinas aderem às cargas negativas das placas de microtitulação utilizadas para o teste de microdiluição em caldo, sendo essa adsorção proporcionalmente maior nas concentrações mais baixas do antibiótico (POIREL et al., 2017a). Uma solução para prevenir essa aderência, é a adição do polissorbatato 80 (P-80 ou Tween 80), concentração final 0,002%, o qual torna as CIMs de polimixinas 4 a 8 vezes menor do que aqueles obtidos sem P-80. Porém, P-80 pode atuar sinergicamente com as polimixinas, conseqüentemente,

gerando CIMs artificialmente baixas. Uma vez que o uso do P-80 ainda é questionável, a utilização de vidraria é uma alternativa, visto que a fixação de colistina no vidro é menos intensa (SADER et al., 2015).

Há uma boa correlação entre valores de CIM para colistina e para polimixina B, embora a colistina possa apresentar CIM ligeiramente maior do que a polimixina B frente a isolados com valores de CIM mais baixos ($CIM \leq 2 \mu\text{g/mL}$), enquanto a polimixina B possa apresentar CIM ligeiramente mais altos do que a colistina em isolados com suscetibilidade diminuída ($CIM \geq 4 \mu\text{g/mL}$) (SADER et al., 2015).

Como alternativas para avaliar de forma precisa e rápida a suscetibilidade às polimixinas foi proposto recentemente o Teste Rápido NP polimixinas. Este teste consiste na detecção do crescimento bacteriano na presença de uma concentração definida de polimixina (polimixina B ou colistina), baseado no metabolismo de carboidrato (glicose). A formação de ácido associada ao metabolismo da glicose pode ser observada através da mudança de cor de um indicador de pH (vermelho para amarelo) e os resultados do teste Rápido NP Polimixinas são lidos a cada hora por até 4 horas. Esse é um teste relevante na decisão terapêutica, visto que define a suscetibilidade dos isolados, em contraste com métodos genotípicos, que detectam apenas o potencial de resistência (NORDMANN et al., 2016a).

Outro teste alternativo que pode ser utilizado é o meio Superpolimixina, o qual é um meio seletivo desenvolvido para detecção de qualquer tipo de micro-organismo Gram-negativo resistente à polimixina. Esse meio foi baseado no meio de eosina metileno azul (EMB), que é seletivo para bactérias Gram-negativas e a concentração ótima de colistina foi estipulada $3,5\mu\text{g/ml}$. Em sua composição o meio apresenta daptomicina com a finalidade de evitar o crescimento de bactérias Gram-positivas e anfotericina B para evitar o crescimento de fungos (NORDMANN et al., 2016b).

Outros produtos comerciais têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a suscetibilidade às polimixinas de forma menos laboriosa, dentre eles o sistema de microdiluição Policimbac® (Policimbac® - Probac do Brasil). Este foi desenvolvido para avaliação de CIM de bacilos Gram-negativos frente à polimixina B em painel comercial com o antibiótico liofilizado (PROBAC, 2018).

Recentemente foi descrita uma técnica denominada Eluição da Colistina, o qual utiliza material de baixo custo e de fácil obtenção na rotina de laboratório de microbiologia (discos de antibióticos em substituição ao pó), bem como tenta diminuir a adesão das polimixinas nas placas de microtitulação, utilizando recipientes de vidro (SIMNER, 2018).

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigo I - Co-ocurrence of *mcr-1* and *bla*_{KPC-2} in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil.

Artigo publicado no periódico Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

Research letters

associated with the spread of an IncF plasmid carrying Tn4401d.⁶ Molecular analyses revealed that *E. coli* #40336 belonged to the ST167 phylogroup A, of the ST10 complex, also reported in US hospitals to spread *bla*_{KPC} genes.⁷

To the best of our knowledge, this is the first report of a KPC-producing Enterobacteriaceae isolated from filter-feeding molluscs, and more globally from a food product bought at a retail market, thereby posing a potential direct threat to public health. Considering the absence of carbapenem use in animals and the global epidemiology of *bla*_{KPC} plasmids and KPC-producing *E. coli* clones, this isolate is most likely of human origin. The mussels sampled here were grown in an area receiving hospital effluents, which is consistent with other data on KPC-producing *K. pneumoniae* reported from wastewater in Austria and Brazil.^{8,9} Together with the very recent finding of KPC-2 in clinical isolates in Tunisia,^{10,11} our data also support the spread of KPC-3 in humans in this country. Such an MDR KPC-producing *E. coli* strain in *M. galloprovincialis* bought at a retail market suggests that other filter-feeding mollusc species may be likely to concentrate carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from the human reservoir. The question of whether the food chain has a role in transferring MDR organisms to humans has been raised repeatedly. Here we have shown that molluscs are likely to be an intermediate step disseminating carbapenem-hydrolysing β -lactamases most probably from hospital activities, and these enzymes could further spread back to the human community through food intake or handling.

Acknowledgements

We thank Thierry Naas for providing us with a Tn4401-positive KPC-producing *K. pneumoniae* control strain and Lotfi Ben Romdhane for technical assistance in WGS analysis.

Funding

This work was supported by the French agency for food, environmental and occupational health & safety (Anses) and also partially supported by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (équipe FRM 2016, DEQ20161136698) to E. D.

Y. M. has a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique in Tunisia.

Transparency declarations

None to declare.

References

- Chen L, Mathema B, Chavda KD et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol* 2014; **22**: 686–96.
- Hamza E, Dorgham SM, Hamza DA. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in broiler poultry farming in Egypt. *J Glob Antimicrob Resist* 2016; **7**: 8–10.

3 Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**: 1503–7.

4 Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; **70**: 119–23.

5 Naas T, Cuzon G, Villegas MV et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla*_{KPC} gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1257–63.

6 Manageira V, Ferreira E, Almeida J et al. Predominance of KPC-3 in a survey for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 3588–92.

7 Chavda KD, Chen L, Jacobs MR et al. Molecular diversity and plasmid analysis of KPC-producing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 4073–81.

8 Chagas TP, Seki LM, da Silva DM et al. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. *J Hosp Infect* 2011; **77**: 281.

9 Galler H, Feierl G, Petternel C et al. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: O132–4.

10 Ben Tanfous F, Alonso CA, Achour W et al. First description of KPC-2-producing *Escherichia coli* and ST15 OXA-48-positive *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia. *Microb Drug Resist* 2017; **23**: 365–75.

11 Battikh H, Harchay C, Dekhili A et al. Clonal spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC and VIM carbapenemases in neonates at a Tunisian university hospital. *Microb Drug Resist* 2016; doi:10.1089/mdr.2016.0175.

J Antimicrob Chemother 2017; **72**: 2404–2406

doi:10.1093/jac/dkx142

Advance Access publication 15 May 2017

Co-occurrence of *mcr-1* and *bla*_{KPC-2} in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil

Tanise Vendruscolo Dalmolin^{1,2}, Luiza Castro¹, Fabiana Q. Mayer³, Alexandre P. Zavascki^{1,4}, Andreza Francisco Martins^{2,5}, Daiana de Lima-Morales¹ and Afonso Luís Barth^{1,2*}

¹LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil;

²Programa De Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ³Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Eldorado do Sul, RS, Brazil; ⁴Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; ⁵ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Univ. Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

© The Author 2017. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

Table 1. MICs (mg/L) of several antibiotics for *E. coli* 3431F, transconjugant 3431T1 (IncX4 *mcr-1*), transconjugant 3431T2 (IncX4 *mcr-1* and IncFIB *bla_{KPC-2}*) and *E. coli* J53

Antibiotic	<i>E. coli</i> 3431F	Transconjugant 3431T1 (IncX4 <i>mcr-1</i>)	Transconjugant 3431T2 (IncX4 <i>mcr-1</i> and IncFIB <i>bla_{KPC-2}</i>)	<i>E. coli</i> J53
Ertapenem	32	0.002	0.125	0.004
Meropenem	32	0.012	0.125	0.023
Imipenem	≥32	0.12	0.5	0.12
Ciprofloxacin	4	≤0.125	≤0.125	≤0.125
Amikacin	2	1	1	≤0.5
Gentamicin	1	0.5	0.5	≤0.125
Tigecycline	0.25	0.25	0.25	0.13
Colistin	4	4	2	≤0.125

MICs were determined by broth microdilution, except those of ertapenem, imipenem and meropenem, which were determined by Etest.

*Corresponding author. Tel: 555133598607; Fax: 555133598760;
E-mail: albarth@hcpa.edu.br

Sir,

Polymyxins are the last resort for the treatment of infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). In November 2015, Liu *et al.*¹ described for the first time a colistin resistance mechanism mediated by a new gene (*mcr-1*), which was present in a transferable plasmid. Since then, several reports have indicated that *mcr-1* has silently spread worldwide since 1980.² Of particular concern is the dissemination of the *mcr-1* gene in CRE, potentially leading to pan-drug-resistant isolates. There are only scattered reports of co-occurrence of *bla_{KPC}* and *mcr-1* genes in the same isolate.^{3,4} This study evaluates the characteristics of the first clinical isolate of *Escherichia coli* harbouring both *mcr-1* and *bla_{KPC-2}* genes in Latin America.

Among 1883 CRE clinical isolates screened, 1 KPC-2-producing *E. coli* was also positive for the *mcr-1* gene (isolate 3431F). This isolate was obtained from a rectal swab of a patient hospitalized, in September 2014, at an emergency room of a general hospital in Porto Alegre city, Rio Grande do Sul, the southernmost Brazilian state.

The *bla_{KPC-2}/mcr-1*-positive clinical isolate carried at least two distinct plasmids, which were successfully transferred to *E. coli* J53 by conjugation. Two transconjugants were further evaluated: the transconjugant 3431FT1, which carried only one plasmid and was positive for *mcr-1*, and the transconjugant 3431FT2, which carried two plasmids and was positive for both *mcr-1* and *bla_{KPC-2}* (Table 1). The 3431F clinical isolate presented high MICs (≥32 mg/L) of the carbapenems and low-level resistance to colistin (MIC 4 mg/L); the transconjugants 3431FT1 and 3431FT2 presented significant increases in the MIC of colistin in comparison with *E. coli* J53 and the transconjugant 3431FT2 also presented increased MICs of the carbapenems (Table 1).

The assembled WGS of the clinical isolate 3431F produced 67 scaffolds, which resulted in an estimated draft genome

4891834 bp in length, with a G + C content of 50.7% and a total of 4819 genomic features. The *in silico* analyses of the data indicated that *E. coli* 3431F belongs to ST744, an *E. coli* lineage usually associated with resistance genes, including a clinical isolate harbouring *mcr-1* and ESBL genes in Denmark.⁵

The WGS data confirmed the presence of the *bla_{KPC-2}* and *mcr-1* genes, as well as several other resistance genes, such as genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes [*strA*, *strB* and *aph(3')-Ia*], a β-lactamase-encoding gene (*bla_{TEM-1}*) and genes related to resistance to macrolides [*mph(A)* and *erm(42)*], phenicols [*floR* and *catA1*], sulphonamides (*sul2*) and tetracycline [*tet(A)* and *tet(B)*].

The *in silico* analyses also allowed identification of the following plasmid incompatibility types in the 3431F isolate: IncN, IncFIB, IncQ1 and IncX4. Detailed analyses indicated that *bla_{KPC-2}* was located in the IncFIB plasmid and *mcr-1* was located in the IncX4 plasmid. *bla_{KPC-2}* was located on a Tn4401 transposon, isoform *b*. The scaffold bearing *bla_{KPC-2}* was 85492 bp in length and no other resistance gene was found in this scaffold.

Detailed analysis of the scaffold bearing the *mcr-1* gene suggested that it was a complete plasmid (a possible circular molecule 33511 bp in length). For this reason, primers were designed to close the gaps in this scaffold and PCRs, followed by Sanger sequencing, confirmed the circular plasmid molecule. This plasmid, which was termed pMCR1poa (GenBank MTJV000000000), presented >99% overall identity as compared with pICBEC72H (GenBank CP015977),⁶ pESTMCR (GenBank KU743383),⁷ pMCR1.2-IT (GenBank KX236309)³ and pMCR1-IncX4 (GenBank KU761327),⁸ and 96% identity with pAf48 (GenBank KX032520).⁹ pMCR1poa harbours an IS*Apl1* insertion and a *pap2* gene upstream and downstream of the *mcr-1* gene, respectively, as also observed in other *mcr-1*-bearing plasmids described in other countries.^{1,3,6-9}

The IncX4-type plasmid carrying the *mcr-1* gene, identified in this study, was previously described in several isolates carrying the *mcr-1* gene, including a clinical isolate obtained from a hospitalized patient in north-eastern Brazil.⁶ Isolates of *E. coli* harbouring the IncX4-type plasmid containing the *mcr-1* gene have

Research letters

also been identified in poultry from southern Brazil by our group (data not shown).

In summary, we report the occurrence of the *mcr-1* gene in a *bla*_{KPC-2}-positive *E. coli* clinical isolate from Brazil. To the best of our knowledge this is the first report of a clinical isolate with both genes in Latin America. In addition, our findings underscore the broad intercontinental distribution of the IncX4 *mcr-1*-bearing plasmid. Considering the low prevalence of the *mcr-1* gene among clinical isolates of CRE observed in our study, it seems that while carbapenem resistance is high, plasmid-mediated colistin resistance is still rare and sporadic among CRE clinical isolates.

Accession number

This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession MTJV00000000. The version described in this paper is version MTJV01000000.

Funding

This work was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) (project no. 16-0559). T. V. D. and D. d. L.-M. were supported by a grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—Brazil (CNPq) and L. C. was supported by a grant from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs).

Transparency declarations

None to declare.

References

- 1 Liu YY, Wang Y, Walsh TR *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* 2016; **16**: 161–8.
- 2 Shen Z, Wang Y, Shen Y *et al.* Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect Dis* 2016; **16**: 293.
- 3 Di Pilato V, Arena F, Tascini C *et al.* MCR-1.2: a new MCR variant encoded by a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 512. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 5612–5.
- 4 Falgenhauer L, Waezsada SE, Yao Y *et al.* Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect Dis* 2016; **16**: 282–3.
- 5 Hasman H, Hammerum AM, Hansen F *et al.* Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill* 2015; **20**: pii=30085.
- 6 Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA *et al.* 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. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 6415–7.
- 7 Brauer A, Telling K, Laht M *et al.* Plasmid with colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from pig slurry in Estonia. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 6933–6.
- 8 Li A, Yang Y, Miao M *et al.* Complete sequences of *mcr-1*-harboring plasmids from extended-spectrum- β -lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 4351–4.
- 9 Poirel L, Kiefer N, Brink D *et al.* Genetic features of MCR-1-producing colistin-resistant *Escherichia coli* isolates in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 4394.

Artigo II – Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil.

Artigo publicado no periódico Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Antimicrobial Susceptibility Studies

Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, BrazilTanise Vendruscolo Dalmolin^{a,b}, Andreza Francisco Martins^{b,c}, Alexandre Prehn Zavascki^d, Daiana de Lima-Morales^a, Afonso Luís Barth^{a,b,*}^a LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil^b Programa De Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil^c ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil^d Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2017

Received in revised form 24 August 2017

Accepted 18 September 2017

Available online 5 October 2017

Keywords:

Resistance genes

Klebsiella pneumoniae

Colistin

Carbapenems

ABSTRACT

We identified one clinical isolate of *K. pneumoniae* harboring the *mcr-1* (plasmid of IncX4 family) and *bla*_{KPC-2} (plasmid of IncFIB family) genes in southern Brazil. These findings highlight that *K. pneumoniae* isolates carrying both *mcr-1* and *bla*_{KPC-2} may emerge as a serious threat to antimicrobial therapy.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Polymyxins are considered the last-resort therapy against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). Until recently, only chromosomal mutations were associated to resistance to polymyxins but in November 2015, Liu and colleagues described the transferable colistin resistance mediated by plasmid (*mcr-1* gene) in human, animal and environmental isolates of Enterobacteriaceae (Liu et al., 2016).

The coexistence of *mcr-1* and carbapenem resistance genes is of great concern, since the treatment options would be seriously compromised (Wang et al., 2017). Although the coexistence of *mcr-1* and carbapenem resistance genes has been described in Enterobacteriaceae, in particular in *Escherichia coli* (Dalmolin et al., 2017; Mulvey et al., 2016; Zheng et al., 2016), only 2 cases of *Klebsiella pneumoniae* harboring *mcr-1* and *bla*_{KPC} genes have been described so far (Aires et al., 2017; Di Pilato et al., 2016). Here we described one case of *K. pneumoniae* harboring both *mcr-1* and *bla*_{KPC-2} genes.

We screened 3468 CRE isolates from several hospitals in southern Brazil recovered between 2013 and 2016 for the *mcr-1* gene. We identified one isolate of *K. pneumoniae* (isolate 3111F) harboring the *mcr-1* gene by PCR using specific primers (Liu et al., 2016); this isolate was also positive by PCR for the *bla*_{KPC} gene which was confirmed as *bla*_{KPC-2} by Sanger sequencing. The isolate 3111F was obtained from a

rectal swab of a patient at an emergence room of a general hospital in Porto Alegre city in southern Brazil, in July 2014. This patient also presented an *Enterobacter cloacae* from a tracheal aspirate which was positive for the *bla*_{KPC} gene but negative for the *mcr-1* gene.

The whole genome of the clinical isolate (3111F) was sequenced by MiSeq™ platform (Illumina Inc.) and data were analyzed using web-tools from the Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org>). Detailed analyses were performed in Geneious software. The assembled whole genome sequencing (WGS) of the 3111F isolate produced 60 scaffolds which resulted in an estimated draft genome of 5,582,745 bp length, with a G + C content of 57.2% and a total of 5496 features.

The analysis of the WGS data showed that plasmids harboring the *mcr-1* and the *bla*_{KPC-2} belonged to an IncX4 group and an IncFIB group, respectively. To the best of our knowledge, all the plasmids supporting *mcr-1* gene described in Brazil, belonged to the IncX4 family (Aires et al., 2017; Dalmolin et al., 2017; Sellera et al., 2017) indicating a high affinity between this plasmid backbone and the *mcr-1* gene in Brazil.

Comparative analyses showed that the plasmid IncX4 harboring *mcr-1* has an IS*Apl1* insertion and *pap2* gene upstream and downstream the *mcr-1* gene, respectively. The plasmid of this study was termed pPOAMCR-1KP (GenBank NH0E00000000). We compared pPOAMCR-1KP with pMCR1.2-IT (Di Pilato et al., 2016) and pMCR1poa (Dalmolin et al., 2017), which originated from isolates harboring *bla*_{KPC} and *mcr-1* genes, in addition pMCR1poa was isolated in Porto Alegre as well.

* Corresponding author. Tel.: +55-5133598607; fax: +55-5133598760.
E-mail address: albarth@hcpa.edu.br (A.L. Barth).

Table 1

Minimal inhibitory concentration (mg/L)* of several antibiotics for *K. pneumoniae* 3111F, Transconjugant 3111FT1 (IncX4 *mcr-1*), Transformant 3111FT2 (IncFIB *bla*_{KPC-2}), *E. coli* J53 and *E. coli* TOP 10.

Antibiotics	MIC (mg/L)				
	3111 F	3111 FT1 (<i>mcr-1</i>)	3111 FT2 (<i>bla</i> _{KPC-2})	<i>E. coli</i> J53	<i>E. coli</i> TOP 10
Ertapenem	256	≤0.5	0.25	≤0.5	0.015
Meropenem	256	≤0.5	0.25	≤0.5	0.03
Imipenem	256	≤0.5	2	≤0.5	0.5
Ciprofloxacin	≥ 64	≤0.12	≤0.12	≤0.12	≤0.12
Amikacin	16	1	≤1	≤1	≤1
Gentamicin	32	0.5	4	≤0.12	0.5
Tigecycline	1	0.12	≤0.03	0.12	≤0.03
Colistin	4	4	≤0.12	≤0.12	≤0.12
Ceftazidime	128	64	16	≤0.5	≤0.5
Cefepime	128	64	32	≤1	≤1

* MICs were performed by broth microdilution.

Both presented 99% identity as compared with the plasmid described in this study, except for a 5681 bp insertion in pPOAMCR-1KP, coding for a transposase sequence.

Other resistance genes related to resistance to aminoglycoside (*aph*(3')-Ia, *ac*(3)-IId and *ac*(6')Ib-cr), β-lactam (*bla*_{SHV11}, *bla*_{CTX-M15}, *bla*_{TEM-1} and *bla*_{OXA-1}), quinolone (*oqx*B and *oqx*A), fosfomicin (*fos*A), macrolide (*mph*(A)), phenicol (*cat*B3), sulfonamide (*su*1), tetracycline (*tet*(A) and *tet*(B)) and trimethoprim (*dfr*A30) were found by *in silico* data analyses.

The *in silico* analyses showed that the *K. pneumoniae* belongs to the sequence type (ST) 437. This ST was observed in many countries such as Spain, China and Brazil, demonstrating that this ST is disseminated worldwide (Pereira et al., 2013; Seara et al., 2015).

Conjugation and transformation experiments were performed in order to confirm the presence of the *mcr-1* and the *bla*_{KPC-2} genes in a plasmidial structure. We were able to obtain one transconjugant carrying only the *mcr-1* gene but none single *bla*_{KPC-2} carrying plasmid transconjugant. We could obtain *bla*_{KPC-2} carrying plasmid only by transformation. This finding is in line with the hypothesis that HicBA toxin/antitoxin system encoded by IncX4 plasmid could kill IncX4 plasmid-free daughter cells, thereby selecting transconjugants carrying only *mcr-1* gene or both *mcr-1* and *bla*_{KPC-2} genes (Dmowski and Jagura-Burdzy, 2013) which was also observed in other studies (Aires et al., 2017; Dalmolin et al., 2017).

The minimal inhibitory concentrations (MICs) of several antibiotics were evaluated by broth microdilution for the clinical isolate, the transformant and the transconjugant. The transconjugant (*mcr-1* positive) presented elevated MIC for colistin, ceftazidime and cefepime and the transformant (*bla*_{KPC-2} positive) presented elevated MIC for the carbapenems, ceftazidime and cefepime – Table 1. Noteworthy, the transconjugant (*mcr-1* positive) was positive for *bla*_{CTX-M} gene, it seems that this transconjugant carry an extra plasmid conferring resistance to cephalosporins, which agrees with the genome *in silico* information.

In Brazil the *mcr-1* gene was initially detected in *E. coli* isolates from diverse origins (Fernandes et al., 2016; Lentz et al., 2016; Sellera et al., 2017) and recently *E. coli* harboring *mcr-1* and KPC-2 was also described (Conceição-Neto et al., 2017; Dalmolin et al., 2017). *K. pneumoniae* isolates carrying both *mcr-1* and *bla*_{KPC} genes are still rare in the world and it was only very recently described in Brazil (Aires et al., 2017). The *mcr-1* in KPC-producing "high-risk" clones such as ST 437 may foster the dissemination of colistin and carbapenem-resistant isolates determined by the feared *mcr-1*/*bla*_{KPC} combination.

Accession Number

This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession NHOE00000000. The version described in this paper is version NHOE00000000.

Funding

This work was supported by Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) (project no. 16-0559) and by a grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Brazil (CNPq).

Transparency Declarations

None to declare.

Acknowledgements

The authors would like to thank Fabiana Q. Mayer, Samuel P. Cibulski and Luiza Castro for technical support.

References

- Aires CAM, da Conceição-Neto OC, Oliveira TRTE, Dias CF, Montezzi LF, Picão RC, et al. Emergence of plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST392 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61(7):e00317-17.
- Conceição-Neto OC, Aires CAM, Pereira NF, da Silva LHJ, Picão RC, Siqueira BN, et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2017;50(2):282-4.
- Dalmolin TV, Castro L, Mayer FQ, Zavascki AP, Martins AF, Lima-Morales D, et al. Co-occurrence of *mcr-1* and KPC-2 in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2017;72(8):2404-6.
- Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, Henrici de Angelis L, Fortunato S, et al. MCR-1.2: a new MCR variant encoded by a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 512. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:5612-5.
- Dmowski M, Jagura-Burdzy G. Active stable maintenance functions in low copy-number plasmids of gram-positive bacteria. *Pol J Microbiol* 2013;62:3-16.
- Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA, Moura Q, Pérez-Chaparro PJ, Esposito F, et al. 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. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:6415-7.
- Lentz SA, de Lima-Morales D, Cupertino VM, Nunes L de S, da Motta AS, Zavascki AP, et al. *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. *Euro Surveill* 2016;21:1-2.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, 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* 2016;16:161-8.
- Mulvey MR, Mataseje LF, Robertson J, Nash JHE, Boerlin P, Toye B, et al. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 2016;16:289-90.
- Pereira PS, de Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother* 2013;68:312-6.
- Seara N, Oteo J, Carrillo R, Perez-Blanco V, Mingorance J, Gomez-Gil R, et al. Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:169-73.
- Sellera FP, Fernandes MR, Sartori L, Carvalho MPN, Esposito F, Nascimento CL, et al. *Escherichia coli* carrying IncX4 plasmid-mediated *mcr-1* and *bla*_{CTX-M} genes in infected migratory Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *J Antimicrob Chemother* 2017;72:1255-6.
- Wang Y, Tian GB, Zhang R, Tyrrel JM, Huang X, Zhou H, et al. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* 2017;17:390-9.
- Zheng B, Dong H, Xu H, Lv J, Zhang J, Jiang X, et al. Coexistence of MCR-1 and NDM-1 in clinical *Escherichia coli* isolates. *Clin Infect Dis* 2016;63:1393-5.

Artigo III - Plasmid-mediated colistin resistance: what do we know?

Artigo publicado no periódico Journal of Infectiology.

Plasmid-mediated Colistin Resistance: What Do We Know?

Tanise V. Dalmolin^{1,2}, Daiana de Lima-Morales¹, Afonso L. Barth^{1,2*}

¹LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

²Programa De Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Article Info

Article Notes

Received: June 13, 2018

Accepted: August 21, 2018

*Correspondence:

Dr. Afonso L. Barth, Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana – LABRESIS, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre-RS, Brazil; Tel.: +55 5133598607; Fax: +55 5133598760; Email: albarth@hcpa.edu.br

©2018 Barth AL. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Keywords

mcr-1 gene
Polymyxins
Antimicrobial resistance
Enterobacteriales
Gram-negative bacteria
Colistin

Abstract

Polymyxins (polymyxin E/colistin and polymyxin B) are considered the last-resort therapy against carbapenem-resistant *Enterobacteriales*; however, the resistance of *Enterobacteriales* to polymyxins is increasing worldwide. Until 2015, this resistance was related to chromosomal mutations, but in November 2015, it was described in China the transferable colistin resistance in animals and humans isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae*, mediated by the *mcr-1* gene (mobile colistin resistance), located in a plasmid. Following the first description of the *mcr-1* gene, it has been reported in several regions of the world, in different bacterial species, from different sources and others *mcr* variants have been described. Moreover, the co-occurrence of the *mcr* gene and other antimicrobial resistance genes was reported. This discovery changed the scenario of resistance to polymyxins, as this gene could be promptly disseminated among Gram negative bacilli becoming a major concern for public health. This review summarizes recent data about the plasmid-borne *mcr* colistin resistance gene.

Introduction

Antimicrobial resistance is considered as a major public health threat to human health mainly due to the widespread of carbapenem-resistant *Enterobacteriales* (CRE) in the last decade. The colistin (polymyxin E) and polymyxin B belong to the class of polymyxins, which are considered the last-resort therapy against CRE; however, the resistance of *Enterobacteriales* to polymyxins is increasing worldwide^{1,2,3}. Overall, colistin resistance in *Enterobacteriales* (excluding species with intrinsic resistance) is around 0.67–1.6%, with low rates in *Escherichia coli* (0.2–0.6%), moderate rates in *Klebsiella pneumoniae* (1.5–6.8%), and much higher rates in *Enterobacter* spp. (13.9–20.1%). Considering other resistance mechanisms associated with colistin resistance such as ESBLs the percentage of co-producers is: 2.3–5.5% for *Enterobacteriales* (>11.5% are *K. pneumoniae*); for carbapenem-non-susceptible isolates the number is higher: 4.5–16.3% for *Enterobacteriales* (32% are *K. pneumoniae*) and even higher is the number found for carbapenemase-producers, 6.2–12.0% for *Enterobacteriales* (14–36.6% are *K. pneumoniae*)⁴.

As mentioned above, polymyxins are active against most *Enterobacteriales* and also have significant activity against nonfermentative Gram-negative bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. Some Gram-negative species are naturally resistant to polymyxins: *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Serratia marcescens*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia cepacia* complex, *Chromobacterium* spp.,

Edwardsiella spp., *Brucella*, *Legionella*, *Campylobacter* and *Vibrio cholerae*.⁵ Additionally, the polymyxins are not active against Gram-negative cocci, Gram-positive and anaerobic bacteria^{5,6}. The natural resistance mechanism is hypothesized to be promoted by constitutive gene expression which adds cationic molecules to the LPS, leading to decreased affinity at the polymyxin site of action on the LPS, differently in Gram-positive bacteria lack of an LPS containing outer cell membrane promotes the resistance⁷.

The colistin was obtained in 1947 from a soil bacteria *Paenibacillus polymyxa* subsp. *colistinus*⁸ and has been cleared to use since 1959 by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of infectious diseases caused by Gram-negative bacteria. However, in clinical use, colistin proved to be nephrotoxic and their use has declined from the early 1970s to the early 2000s, being replaced by more active and less-toxic antibiotics such as the aminoglycosides, quinolones and beta-lactams. However, due to increasing prevalence of multiresistant Gram-negative bacteria, the colistin were re-introduced into clinical practice as a valuable therapeutic option^{5,9}.

Unlike in human medicine, in veterinary medicine, colistin has been used extensively, and without interruption, for decades for the treatment and prevention of infectious diseases by *Enterobacteriales*, as well as growth promoter in poultry and pigs^{2,5,9}. However, due to the description of the colistin resistance mediated by a mobile genetic element and its widespread in animals in China in 2015, the Ministry of Agriculture of China decided to ban colistin as a feed additive for animals in 2016. Other countries also decided to ban colistin as growth animal promoter, due to the imminent impact on polymyxin resistance in human health¹⁰.

The mechanism of action of polymyxins (colistin and polymyxin B) occurs by the electrostatic binding of the molecule to the lipopolysaccharide (LPS) and phospholipids in the outer membrane of Gram-negative bacteria. The polymyxins destabilize the LPS through the exchange of ions (Ca^{+2} and Mg^{+2}), increasing the permeability of the bacterial membrane, promoting the extravasation of the cytoplasmic content and consequent bacterial death. Despite the fact that the initial target for polymyxin is the LPS, the exact mode of action of polymyxins is still not totally clear. There are other possible mechanisms of action described for polymyxins: the endotoxin effect (during cell lysis the endotoxin molecule - the lipid A which is the main component of the LPS) is released and the polymyxins are able to bind and neutralize it and the inhibition of respiratory enzymes (type II NADH-quinone oxidoreductases [NDH-2]) in the bacterial membrane^{5,11}.

Until 2015, the reports of polymyxin resistance were all due to chromosomal mutations. These chromosomal

mutations lead to modification of the LPS via cationic substitution that alter the lipid A, decreasing its affinity for the polymyxins, similarly to that observed in bacteria with intrinsic resistance to polymyxins. There are several mutation in genes and operons which are involved in the modification of the LPS: (i) mutations in genes (*pmrC*, *pmrE* and *pmrHFIJKLM*) responsible for synthesis of cationic groups and their addition to the LPS; (ii) mutations in regulatory genes that encode proteins involved in the PmrAB system in *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* and *Salmonella enterica* (*pmrA* and *pmrB* genes) and the PhoPQ system in *K. pneumoniae* and *E. coli* (*phoP* and *phoQ* genes); (iii) and mutations in the regulators of these systems as the *mgrB* gene in *Klebsiella* spp. (regulates the PhoPQ system) and *crrAB* operon in *K. pneumoniae* (regulates the PmrAB system)¹².

In November 2015, Liu and colleagues described the transferable colistin resistance in animals and humans isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* recovered in China, mediated by the *mcr-1* gene (mobile colistin resistance). The *mcr-1* gene is located in a plasmid and its discovery changed the scenario of resistance to polymyxins, as this gene could be promptly disseminated among Gram-negative bacilli becoming a major concern for public health. MCR-1 protein is a member of the phosphoethanolamine transferase family, its acquisition promotes the addition of phosphoethanolamine (PETN) to lipid A, similarly to the chromosomal mutations, resulting in reduction of polymyxin affinity¹.

Epidemiology of Plasmid-mediated Colistin Resistance

Following the first description of the *mcr-1* gene, it has been reported in several regions of the world, including countries of Asia, Africa, Europe and America^{2,12,13}. Further studies indicated that bacteria carrying the *mcr-1* gene were identified in the 1980's in China. The earliest report of the *mcr-1* gene among isolates from humans is from 2008 and it was described in a *Shigella sonnei* from Vietnam. These findings indicate that *mcr-1* gene has existed in *Enterobacteriales* but remained not identified for a long time^{9,14}.

The *mcr-1* gene has been reported in several species of *Enterobacteriales* but mostly in *E. coli*. The occurrence in *Salmonella*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Vibrio* and *Enterobacter* was only sporadically reported, but indicates interspecies gene transfer^{2,12}.

The *mcr-1* gene has been mainly detected in *E. coli* isolates obtained from animals (livestock, wild animals and food of animal origin). Farm animals, in particular pigs and chickens, have been considered as reservoirs for *E. coli* isolates carrying the *mcr-1* gene. In humans, *Enterobacteriales* carrying the *mcr-1* gene have

been obtained from clinical samples, as well as from asymptomatic patients, including international travellers. The possible dissemination of the *mcr-1* gene from bacteria obtained from animals to bacteria from humans is a serious concern, mainly whether this gene could be transferred into carbapenemase producing *Enterobacterales*^{2,9,12}.

MCR-1 producers may exhibit low level resistance to colistin or polymyxin B (minimum inhibitory concentration [MIC] of 4µg/mL) and a few cases of isolates carrying the *mcr-1* gene which are susceptible to colistin have already been described^{15,16}. This may contribute to the silent dissemination of *mcr-1* gene harbouring isolates. Other aspects may also play an important role in the dissemination of the *mcr-1* gene: the technical problems related to the detection of resistance to polymyxins and the fact that most laboratories only evaluate the susceptibility profile to polymyxins among carbapenem non-susceptible isolates¹⁵.

One explanation for the reported *mcr-1* positive but colistin susceptible isolates was that the gene was truncated as described in a *Shigella sonnei* isolate¹⁷. Interestingly, the truncated *mcr-1* gene could be re-activated after conjugation experiments resulting in a colistin resistant phenotype¹⁸. Conversely, the report of an *E. coli* colistin susceptible and *mcr-1* positive with an intact gene indicates that the gene truncation is not the only mechanism related to the susceptibility to polymyxins among *mcr-1* harboring isolates¹⁹.

According to an search assessment of the data at the GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> - 17th of June 2018), 13 *mcr-1* subgroups were already described in several countries, differing from *mcr-1* by only one nucleotide: *mcr-1.2* (*K. pneumoniae* from Italy)²⁰, *mcr-1.3* (*E. coli* from China)²¹, *mcr-1.4* (*E. coli* from China), *mcr-1.5* (*E. coli* from Argentina), *mcr-1.6* (*Salmonella typhimurium* from China)²², *mcr-1.7* (*E. coli* from China), *mcr-1.8* (*E. coli* from Brunei)²³, *mcr-1.9* (*E. coli* from China)²⁴, *mcr-1.10* (*Moraxella* spp. from Great Britain)²⁵, *mcr-1.11*

(KY853650.1), *mcr-1.12* (LC337668.1) and *mcr-1.13* (*E. coli* from Italy)²⁶.

To date, eight *mcr* variants have been described: *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7* and *mcr-8* (Table 1). The *mcr-2* gene is 1,617 bp long, nine bases shorter than *mcr-1* (1,626 bp) and it has 76.7% nucleotide identity to *mcr-1*²⁷. The *mcr-3* gene presented 45.0% and 47.0% nucleotide sequence identity to *mcr-1* and *mcr-2*, respectively. MCR-3 also showed 94.1% to 94.8% amino acid identity with proteins found in three *Aeromonas* species. Moreover, a truncated transposon element (TnAs2), which was characterized only in *Aeromonas salmonicida*, was located upstream of *mcr-3*. These findings suggest that *mcr-3* gene in *Enterobacterales* might have originated from *Aeromonas* species²⁸. Unusually, the *mcr-4* is inserted in a small and not self-conjugative plasmid. However, the addition of an auxiliary plasmid can promote conjugation²⁹.

Co-occurrence of *mcr* and Other Resistance Genes

There have been reports of co-production of the *mcr-1* gene and other resistance genes in several bacterial species. The presence of the *mcr-1* gene has been associated with ESBLs (CTX-M, SHV and TEM type) and AmpC cephalosporinase (CMY type). Moreover, there are descriptions of co-occurrence of the *mcr-1* gene and quinolone resistance genes (*qnrS* and *aac(6)-Ib-cr*)^{9,15,33,34}.

Isolates carrying *mcr-1* and carbapenemase resistance genes have been described in *Enterobacterales*. Specifically, the co-production of *mcr-1* and carbapenem resistance genes is of great concern, since polymyxins represent the "last-line" therapeutic option for an infection caused by a carbapenemase-producing isolate. In the literature the *mcr-1* gene has been found mainly in isolates that produce the carbapenemase NDM in particular among *E. coli* isolates from animal and human origin^{35,36,37}. However, it was also detected in *Cronobacter sakazakii*³⁸ from animal origin and *K. pneumoniae*³⁹ from human origin. Only one report about co-producer OXA-48 carbapenemase and *mcr-1*⁴⁰ and

Table 1. *mcr* variants available at the GenBank database (update in July 17, 2018- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

Gene	Country	Origin	Species	Reference	Variants
<i>mcr-1</i>	China	Retail meat from chicken and pig, and inpatients ^a	<i>E. coli</i> and <i>K. pneumoniae</i>	1	<i>mcr-1.2 – mcr-1.13</i>
<i>mcr-2</i>	Belgium	Pig and bovine	<i>E. coli</i>	27	<i>mcr-2.2</i>
<i>mcr-3</i>	China	Pig	<i>E. coli</i>	28	<i>mcr-3.2-mcr-3.12</i>
<i>mcr-4</i>	Italy, Spain and Belgium	Pig	<i>Salmonella enterica</i> and <i>E. coli</i>	29	<i>mcr-4.2</i>
<i>mcr-5</i>	Germany	Faecal content of pigs and faecal samples from pigs	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Paratyphi B</i>	30	<i>mcr-5.2</i>
<i>mcr-6^b</i>	Great Britain	Faecal contents of healthy pigs	<i>Moraxella</i> sp.	25	-
<i>mcr-7</i>	China	Chickens	<i>K. pneumoniae</i>	31	-
<i>mcr-8</i>	China	Pig, chicken and inpatient	<i>K. pneumoniae</i>	32	

^aThe gene *mcr-1* was isolated from several other origin, after its first publication from Liu et al., 2016¹.

^b *mcr-2.2* (1617 bp) has been renamed as *mcr-6*.

VIM carbapenemase and *mcr-1*⁴¹ have been related in the literature, both from human sources. There are a few KPC and *mcr-1* co-producers reported, in particular those genes were identified in *E. coli*^{42,43,44,45,46} and less frequently in *K. pneumoniae* isolates^{20,47,48}.

Genetic Context of the *mcr* Gene

The first plasmid carrying the *mcr-1* gene belonged to the plasmid incompatibility type IncI2¹. Others studies indicated that *mcr-1* gene is not restricted to the IncI2 plasmid group and various plasmids may carry the *mcr-1* gene including those belonging to the IncX4, IncHI2, IncF, IncHI1, IncY and IncP^{33,49}. These incompatibility groups of plasmids have been implicated in the global spread of others resistance genes among *Enterobacteriales* from human and animal sources^{50,51}. As the *mcr-1* gene is not associated with a specific incompatibility group of plasmids, it can be considered that this molecular flexibility promotes global dissemination of the gene⁵².

Noteworthy, there are intriguing descriptions of coexistence of two *mcr* bearing plasmids in a single bacterial isolate. Nevertheless, the MIC for colistin of the isolates presenting more than one *mcr* gene in different plasmids was not increased^{52,53}.

Often the *mcr* gene is flanked by an insertion sequence designated IS*Ap1* and the *nikB* gene, in this order. It is suggested that the IS*Ap1* is a key component in the mobilization of the *mcr* gene. IS*Ap1* belongs to the IS30 family and was first identified in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, a Gram-negative bacterium of the *Pasteurellaceae* family, causing pig necrotic pleuropneumonia^{42,49,54}.

It is also suggested that the *mcr-1* gene had been initially mobilized by two copies of IS*Ap1* from an unknown progenitor. Over the course of evolution, this complex transposon has lost one or both copies of IS*Ap1*, since it is common for IS30 family member to lose a copy of the IS element by transposition or illegitimate recombination events, in order to stabilize the *mcr-1* bearing plasmid. Sometimes the *mcr-1* gene can be mobilized by only a single copy of IS*Ap1* upstream the gene in combination to an incomplete sequence of the IS*Ap1* downstream. IS*Ap1* is presents in multiple copies in the genome and these insertion sequence sites are notable for their high AT content^{49,52,55,56}.

As already mentioned, the *mcr-1* gene was originally described mostly among *E. coli* isolates from animal sources and this indicates that this gene is of animal origin. The genetic context of the *mcr-1* gene reinforces the theory that the gene was originally from isolates obtained from animals. The first evidence is that the *mcr-1* gene is very often associated to the insertion sequence IS*Ap1* and this insertion sequence is usually identified in bacteria of animal origin. Another indicative of the animal origin

and the genetic context of the *mcr-1* is the presence of other antibiotic resistance genes specific to veterinary medicine, such as the floR gene which confers resistance to florfenicol⁵⁷.

Moreover, the *Moraxella* genus was identified as potential reservoirs of *mcr*-like genes that might be mobilized from their original host to become an acquired resistance mechanism in clinically significant species. The *mcr-1* and *mcr-2* genes present a significant identity with intrinsic chromosomal genes of the *Moraxella* species. The exact species of the progenitors of *mcr-1* and *mcr-2* genes remains to be determined, but the most closely-related variant compared to MCR-1 was identified in *Moraxella varci*, while the most closely-related variant of MCR-2 was identified in *Moraxella osloensis*⁵⁷.

Detection of MCR-Producers

Broth microdilution (BMD) is considered the reference test for determining the susceptibility profile of polymyxins regardless the fact that BMD do not establish the underlying mechanism of resistance⁵⁸. There are a few phenotypic tests which are supposedly able to detect MCR producers, including: the Colistin MAC Test (CMT)⁵⁹; Combined Disc Test (CDT); Colistin MIC Reduction (CMR); Modified Rapid Polymyxin NP Test (modified-RPNP) and alteration of Zeta potential tests⁶⁰. Nevertheless, the molecular tests are considered the reference tests for the detection of the *mcr* gene; the molecular techniques using sequencing can also specify the gene variants.

Assays based on colistin MIC reduction in the presence of dipicolinic acid (DA) or ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) have been evaluated to detect *mcr*-producing *Enterobacteriales*^{59,60}. These tests are based on the fact that the catalytic domains of the MCR enzymes resemble that of zinc metalloproteins⁶¹. DA or EDTA are able to chelate zinc (necessary for the enzymatic activity of the PETn transferase) and consequently can inhibit the enzymatic activity of MCR-1 and finally reduce colistin resistance in MCR-producing strains.

The CMT method is a broth microdilution method, in which colistin MIC (0.125 to 8.0 µg/mL) is tested in absence and in presence of fixed concentration of the DA (900 µg/mL). If the MIC increases ≥8-fold, in the presence of DA, the result is interpreted as *mcr*-positive while an MIC reduction of ≤2-fold is interpreted as *mcr*-negative. The test does not present satisfactory results with *K. pneumoniae*, probably due to a reduced permeability to DA and/or the presence of additional unknown mechanisms. In addition, the authors tested the effect of DA in increasing colistin susceptibility of *mcr-1* positive isolates, in a disc-diffusion format, however no significant difference was detected as the inhibition zones between *mcr-1*-positive and *mcr*-negative isolates were very similar⁵⁹.

Similarly, Esposito *et al.* (2017)⁶⁰ evaluated four EDTA-based assays to detect MCR-1-positive isolates. The CDT test compare the inhibition zones of colistin (10µg) and colistin plus EDTA (100mM). An incremental difference of ≥ 3 mm between the colistin impregnated disc and the colistin-EDTA-impregnated disc was interpreted as MCR-1-positive. The CDT presented sensitivity and specificity of 96.7% and 89.6%, respectively⁶⁰.

The CMR test was designed according to the BMD method with or without the addition of 80µg/ml EDTA, into the wells containing 0.06–32µg/ml of colistin. A ≥ 4 -fold colistin MIC reduction in EDTA-containing wells was interpreted as MCR-1-positive. The sensitivity and specificity of this method was 96.7% and 83.3%, respectively⁶⁰.

The original RPNP test consists of detecting bacterial growth on a glucose based medium, in the presence of a defined concentration of colistin. The bacterial growth leads to acid formation in the medium which alters the pH and this can be detected visually by a pH indicator color change⁶². If the well containing colistin, change its colour from orange to yellow, it is considered positive (colistin resistance). The modified RPNP is based on the incorporation of two extra wells, one containing 80µg/mL EDTA (without colistin) and the other one containing 80µg/ml EDTA plus 5µg/ml colistin. In this case, the MCR-1 positive result is observed when the colistin containing solution supplemented with EDTA remained orange (i.e., absence of glucose metabolization due to EDTA inhibition). The sensitivity and specificity of this test are higher (96.7% and 100.0%, respectively) compared to CDT and CMR tests⁶⁰.

Another method for phenotypic detection of *mcr* producers is the alteration of Zeta potential in the absence and presence of 80 µg/ml EDTA, which increase the anionic charges on the surface membrane of MCR-1-positive isolates. However, according to the authors, this method can only be used in well-resourced microbiology laboratories⁶⁰.

Polymerase Chain Reaction (PCR) and Whole Genome Sequence (WGS) are considered the reference tests to identify the *mcr* gene from cultured bacteria as well as in clinical, fecal, environmental and food samples^{58,63}. While PCR can only detect known *mcr* genes, due to specific primers and probes, the WGS can identify all known or unknown colistin resistance mechanisms within 2 days⁵⁸. Further molecular tests are the commercial microarray that can simultaneously detect both β -lactamases and *mcr-1/-2* genes, even though those tests are inaccessible to under-resourced laboratories⁶⁴.

Conclusion

Considering the importance of polymyxins in human and veterinary medicine, there is an urgent need to limit the propagation of *mcr-1* harboring plasmid. Given the constant

exchange of resistance genes in all microbiomes (animals, environment and human population), surveillance programs to monitor the diversity of reservoirs, plasmids and to evaluate the real dimension of resistance mediated by the *mcr* gene are necessary.

Funding Information

This work was supported by Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) (project no.16-0559) and by a grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Brazil (CNPq).

References

- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, 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.* 2016; 16: 161-8.
- Irrgang A, Roschanski N, Tenhagen BA, et al. Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from livestock and food in Germany, 2010–2015. *PlosOne.* 2016; 11 (7): e0159863.
- Nordmann P, Jayol A, Poirel L, et al. A universal culture medium for screening polymyxin-resistant Gram-negative isolates. *J Clin Microbiol.* 2016; 54 (5): 1395-9.
- Sherry N, Howden B. Emerging Gram-negative resistance to last-line antimicrobial agents fosfomycin, colistin and ceftazidime-avibactam - epidemiology, laboratory detection and treatment implications. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018; 16 (4): 289-306.
- Poirel L, Jayol A, Nordmann P, et al. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30 (2): 557-96.
- Sader HS, Rhomberg PR, Farrell DJ, et al. Differences in potency and categorical agreement between colistin and polymyxin B when testing 15,377 clinical strains collected worldwide. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015; 83 (4): 379-81.
- Srinivas P, Rivard K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. *Curr Infect Dis Rep.* 2017; 19: 38.
- Benedict RG, Langlykke AF. Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*. *J Bacteriol.* 1947; 54: 24.
- Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill.* 2016; 21 (9): 30155.
- Walsh TR, Wu Y. China bans colistin as a feed additive for animals. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16 (10): 1102-3.
- Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60 (6): 1206-15.
- Ye H, Li Y, Li Z, et al. Diversified *mcr-1*-harbouring plasmid reservoirs confer resistance to colistin in human gut microbiota. *mBio.* 2016; 7 (2): e00177-16.
- Prim N, Rivera A, Rodríguez-Navarro J, et al. Detection of *mcr-1* colistin resistance gene in polyclonal *Escherichia coli* isolates in Barcelona, Spain, 2012 to 2015. *Euro Surveill.* 2016; 21 (3): 30183.
- Shen Z, Wang Y, Shen Y, et al. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16 (3): 293.
- Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro Surveill.* 2016; 21 (17): 30214.

16. Lentz SA, de Lima-Morales D, Cupertino VM, et al. Letter to editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. *Euro Surveill*. 2016; 21 (26): 1-2.
17. Pham Thanh D, Thanh Tuyen H, Nguyen Thi Nguyen T, et al. Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne *mcr-1* gene in a 2008 Vietnamese *Shigella sonnei* isolate. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71(8): 2314-7.
18. Terveer EM. Prevalence of colistin resistance gene (*mcr1*) containing Enterobacteriaceae in feces of patients attending a tertiary care hospital and detection of a *mcr-1* containing, colistin susceptible *E. coli*. *PLoS ONE*. 2017; 12 (6): e0178598.
19. Liassine N, Assouvie L, Descombes MC, et al. Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract Enterobacteriaceae in Switzerland. *Int J Infect Dis*. 2016; 51: 4-5.
20. Di Pilato V, Arena F, Tascini C, et al. *mcr-1.2*, a new *mcr* variant carried on a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 512. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60: 5612-5.
21. Lu X. *mcr-1.3*: a new *mcr* variant carried by an IncP plasmid in a colistin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from a healthy individual. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017. In press.
22. Yang YQ, Li YX, Song T, et al. Colistin resistance gene *mcr-1* and its variant in *Escherichia coli* isolates from chickens in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61 (5): e01204-16.
23. Tijet N, Faccione D, Rapoport M, et al. Molecular characteristics of *mcr-1*-carrying plasmids and new *mcr-1* variant recovered from polyclonal clinical *Escherichia coli* from Argentina and Canada. *PlosOne*. 2017; 12 (7): e0180347.
24. Liu H, Zhu B, Liang B, et al. A Novel *mcr-1* variant carried by an IncI2-Type plasmid identified from a multidrug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2018; 9: 815.
25. AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, et al. *mcr-1* and *mcr-2* variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72 (10): 2745-9.
26. Alba P, Leekitcharoenphon P, Franco A, et al. Molecular epidemiology of *mcr*-encoded colistin resistance in Enterobacteriaceae from food-producing animals in Italy revealed through the eu harmonized antimicrobial resistance monitoring. *Front Microbiol*. 2018; 9: 1217.
27. Xavier BB, Lammens C, Ruhai R, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill*. 2016; 21 (27): 30280.
28. Yin W, Li H, Shen Y, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio*. 2017; 8 (3): e00543-17.
29. Carattoli A, Villa L, Feudi C, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill*. 2017; 22 (31): 30589.
30. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, et al. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72: 3317-24.
31. Yang YQ, Li YX, Lei CW, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 73 (7): 1791-5.
32. Wang X, Wang Y, Zhou Y, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect*. 2018; 7 (1): 122.
33. Hasman H, Hammerum AM, Hansen F, et al. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark. *Euro Surveill*. 2016; 20 (49): 30085.
34. Rapoport M, Faccione D, Pasteran F, et al. *mcr-1*-mediated colistin resistance in human infections caused by *Escherichia coli*: First description in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60 (7): 4412-2.
35. Li Y, Sun QL, Shen Y, et al. Rapid increase in prevalence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) and emergence of colistin resistance gene *mcr-1* in CRE in a hospital in Henan, China. *J Clin Microbiol*. 2018; 56(4): e01932-17.
36. Wang R, Liu Y, Zhang Q, et al. The prevalence of colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from food animals in China: coexistence of *mcr-1* and *bla_{NDM-5}* with low fitness cost. *Int J Antimicrob Agents*. 2018; 51(5): 739-44.
37. Bulman ZP, Chen L, Walsh TJ, et al. Polymyxin combinations combat *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *bla_{NDM-5}*: preparation for a postantibiotic era. *MBio*. 2017; 8 (4): e00540-17.
38. Liu YY, Chandler CE, Leung LM, et al. Structural modification of lipopolysaccharide conferred by *mcr-1* in Gram-negative ESKAPEPathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61 (6): e00580-17.
39. Du H, Chen L, Tang YW, et al. Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16 (3): 287-8.
40. Mulvey MR. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16 (3): 289-90.
41. Poirel L, Kieffer N, Liassine N, et al. Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16 (3): 281.
42. Falgenhauer L, Waezsada SE, Yao Y, et al. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended spectrum β -lactamase producing and carbapenemase producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16 (3): 280.
43. Conceição-Neto OC, Aires CAM, Pereira NF, et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2017; 50 (2): 282-4.
44. Dalmolin TV, Castro L, Mayer FQ, et al. Co-occurrence of *mcr-1* and *bla_{KPC-2}* in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72 (8): 2404-6.
45. Tacão M, Tavares RDS, Teixeira P, et al. *mcr-1* and *bla_{KPC-3}* in *Escherichia coli* Sequence Type 744 after meropenem and colistin therapy, Portugal. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23(8): 1419-21.
46. Zhao D, Zhou Z, Hua X, et al. Coexistence of *mcr-1*, *bla_{KPC-2}* and two copies of *fosA3* in a clinical *Escherichia coli* strain isolated from urine. *Infect Genet Evol*. 2018; 60:77-9.
47. Aires CAM, da Conceição-Neto OC, Tavares E Oliveira TR, et al. Emergence of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61 (7): e00317-17.
48. Dalmolin TV, Martins AF, Zavascki AP, et al. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018; 90 (2): 132-3.
49. Poirel L, Kieffer N, Nordmann P. In vitro study of ISAp1-mediated mobilization of the colistin resistance gene *mcr-1*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61 (7): e00127-17.
50. Campos J. MCR-1 in multidrug-resistant and copper-tolerant clinically relevant *Salmonella* 1, 4, [5], 12: I - and S. Rissen clones in Portugal, 2011 to 2015. *Euro Surveill*. 2016; 21 (26): 30270.
51. Tse H, Yuen KY. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16 (2): 145-6.

-
52. Zurfluh K, Nüesch-Inderbinen M, Klumpp J, et al. Key features of *mcr-1* bearing plasmids from *Escherichia coli* isolated from humans and food. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017; 6: 91.
 53. Liu L, Feng Y, Zhang X, et al. New variant of *mcr-3* in an extensively drug-resistant *Escherichia coli* clinical isolate carrying *mcr-1* and *bla_{NDM-5}*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61 (12): e01757-17.
 54. Petrillo M, Angers-Loustau A, Kreysa J. Possible genetic events producing colistin resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16 (3): 280.
 55. Snesrud E, Ong AC, Corey B, et al. Analysis of serial isolates of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* reveals a highly active IS*Apl1* transposon. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61 (5): e00056-17.
 56. Snesrud E, He S, Chandler M, et al. A model for transposition of the colistin resistance gene *mcr-1* by IS*Apl1*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60 (11): 6973-6.
 57. Kieffer N, Nordmann P, Poirel L. *Moraxella* species as potential sources of MCR-like polymyxin resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61 (6): e00129-17.
 58. Sekyere JA, Asante J. Emerging mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria and fungi: advances in the era of genomics. *Future Microbiol*. 2018; 13: 241-62.
 59. Coppi M, Cannatelli A, Antonelli A, et al. A simple phenotypic method for screening of MCR-1-mediated colistin resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24 (2): 201.
 60. Esposito F, Fernandes MR, Lopes R, et al. Detection of colistin-resistant MCR-1-positive *Escherichia coli* by use of assays based on inhibition by EDTA and Zeta Potential. *J Clin Microbiol*. 2017; 55 (12): 3454-65.
 61. Hinchliffe P, Yang QE, Portal E, et al. Insights into the mechanistic basis of plasmid-mediated colistin resistance from crystal structures of the catalytic domain of MCR-1. *Sci Rep*. 2017; 7: 39392.
 62. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2016; 22 (6): 1038-43.
 63. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveill*. 2018; 23 (6): 180215-1.
 64. Bernasconi OJ, Principe L, Tinguely R, et al. Evaluation of a new commercial microarray platform for the simultaneous detection of beta-lactamase and *mcr-1* and *mcr-2* genes in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2018; 55: 3138-41.
-

Artigo IV – Low prevalence of the *mcr-1* gene among carbapenemase producing clinical isolates of *Enterobacterales*.

Artigo publicado no periódico Infection Control and Hospital Epidemiology.

Letter to the Editor

Low prevalence of the *mcr-1* gene among carbapenemase-producing clinical isolates of *Enterobacteriales*

Tanise Vendruscolo Dalmolin^{1,2}, Priscila Lamb Wink¹, Daiana de Lima-Morales¹ and Afonso Luís Barth^{1,2}

¹Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, LABRESIS, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil and ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

To the Editor—Polymyxins are the last resort for the treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria, in particular carbapenem-resistant *Enterobacteriales* (CRE). Resistance to polymyxins used to be due only to chromosomal mutations, but in November 2015, Liu et al¹ described for the first time a colistin resistance mechanism mediated by a new gene (*mcr-1*) that was present in a transferable plasmid. The *mcr-1* has already been described on most continents, being detected in different species and obtained from several sources, including carbapenemase-producing clinical isolates.^{2,3} Infections due to clinical isolates harboring the *mcr-1* and a carbapenem resistance gene is of particular concern because the treatment options would be seriously compromised.⁴

The aim of this study was to evaluate the prevalence of carbapenemase and *mcr-1* genes co-occurring among *Enterobacteriales* clinical isolates in southern Brazil between April 2013 and May 2018.

We evaluated the occurrence of the *mcr-1* gene among 4,778 isolates of *Enterobacteriales* with reduced susceptibility to carbapenems obtained from an epidemiologic study in several hospitals in southern Brazil. All isolates were submitted to multiplex real-time polymerase chain reaction with high-resolution melting (RT-PCR-HRM) analysis with primers for *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{GES}, *bla*_{IMP}, and *bla*_{VIM} and presented positive results for at least 1 of the carbapenemase gene(s) tested.

The presence of the *mcr-1* gene was evaluated by pooling 10 isolates together and submitting them to DNA extraction and conventional PCR with specific primers for the *mcr-1* gene.¹ All isolates from a pool with *mcr-1* positive result were retested individually by the same conventional PCR to identify the isolate(s) that presented the gene. The amplicons from the individual isolates with positive result in the conventional PCR were submitted to Sanger sequencing and were confirmed as the *mcr-1* variant. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of several antibiotics were evaluated using broth microdilution method for the individual isolates positive for the *mcr-1* gene, and the results were interpreted according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines.⁵

We found only 5 isolates that presented the *mcr-1* gene and a carbapenemase gene. All coharboring isolates presented the *mcr-1*

and the *bla*_{KPC} genes. We obtained 2 coharboring isolates (*Klebsiella pneumoniae* 3111F and *Escherichia coli* 3431F) in 2014, 1 coharboring isolate (*E. coli* 5798F) in 2016, and the other 2 coharboring isolates (*K. pneumoniae* 6701F and *E. coli* 6699F) in 2018. All 5 isolates were recovered from rectal swabs, with exception of *E. coli* 6699F, which was recovered from an ascites fluid.

Moreover, 4 isolates presented low-level resistance to colistin (4 mg/L), and 1 isolate (*K. pneumoniae* 6701F) was susceptible to colistin (0.25 mg/L). All isolates were resistant to ertapenem, meropenem, imipenem, and ciprofloxacin and were susceptible to tigecycline. Susceptibility to aminoglycosides was variable, with most isolates susceptible to gentamicin and intermediate to amikacin (Table 1).

The prevalence of the *mcr-1* gene was very low (0.1%) among carbapenemase-producing *Enterobacteriales* (CPE) in our study. This rate is lower than that reported in Portugal, where 6.69% of the CPE isolates from colonized and infected patients were positive for the *mcr-1* gene.⁶ In Belgium, the prevalence reported was <1% among CRE of human origin.⁷ These findings demonstrate that the prevalence of *mcr-1* with carbapenemase genes is normally very low, although it can differ among countries.

The *mcr-1* gene is usually evaluated only among colistin-resistant isolates (MIC >2 mg/L); however, the isolate *K. pneumoniae* 6701F was susceptible to colistin. Some isolates are *mcr-1* positive; nonetheless they are colistin susceptible. One explanation for this is the assumption that the gene might be truncated in isolates positive for the *mcr-1* but susceptible to colistin, as already described in *Shigella sonnei*.⁸ Interestingly, the truncated *mcr-1* gene could be reactivated after conjugation experiments, resulting in a colistin resistant phenotype.⁹ However, a truncated gene is not the only reason to justify the susceptibility; one study reported an *E. coli* colistin-susceptible *mcr-1* positive isolate that presented an intact gene.¹⁰ Therefore, further studies are needed to elucidate the reason why the *mcr-1* gene of the *K. pneumoniae* 6701F in this study does not promote resistance to colistin. In fact, colistin-susceptible *mcr-1* isolates may be contributing to a silent spread of the *mcr-1* gene, which may be transferred to multidrug-resistant isolates such as the CPE described in this study.

In conclusion, the current prevalence of *mcr-1* is very low, but the detection of 2 isolates in 2018 coharboring *bla*_{KPC}/*mcr-1* genes is a warning for a possible increase in the prevalence of these isolates in the coming years. Considering the association of

Author for correspondence: Afonso Luís Barth, LABRESIS, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Brazil. E-mail: albarth@hcpa.edu.br

Cite this article: Dalmolin TV, et al. (2018). Low prevalence of the *mcr-1* gene among carbapenemase-producing clinical isolates of *Enterobacteriales*. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2018, 1–2. doi: 10.1017/ice.2018.301

Table 1. Minimal Inhibitory Concentration (MIC)^a of Several Antibiotics for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Coharboring *bla_{KPC}*/*mcr-1* Genes

Antibiotic	<i>E. coli</i> 3431F, MIC (mg/L)	<i>E. coli</i> 5798F, MIC (mg/L)	<i>E. coli</i> 6699F, MIC (mg/L)	<i>K. pneumoniae</i> 3111F, MIC (mg/L)	<i>K. pneumoniae</i> 6701F, MIC (mg/L)
Ertapenem	32	16	256	256	128
Meropenem	32	8	256	256	128
Imipenem	≥ 32	16	256	256	16
Ciprofloxacin	4	≥ 64	32	≥ 64	64
Amikacin	2	8	8	16	8
Gentamicin	1	2	4	32	0.5
Tigecycline	0.25	1	0.5	1	0.25
Colistin	4	4	4	4	0.25

^aPerformed by broth microdilution.

mcr-1 with the broad-spectrum resistance mechanisms (eg, carbapenemases), this emergence is of great concern.

Acknowledgments. The authors would like to thank Luiza Castro for technical support.

Financial support. This work was supported by Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA project no. 16-0559) and by a grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—Brazil (CNPq).

Conflicts of interest. All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

References

- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, *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* 2015;16:161–168.
- Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill* 2016;21:30155.
- Dalmolin TV, Castro L, Mayer FQ, *et al.* Co-occurrence of *mcr-1* and KPC-2 in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:2404–2406.
- Wang Y, Tian GB, Zhang R, *et al.* Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive *Enterobacteriaceae* in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* 2017;17:390–399.
- Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) website. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/2018. Published 2018. Accessed October 30, 2018.
- Mendes AC, Novais A, Campos J, *et al.* *mcr-1* in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients, Portugal, 2016–2017. *Emerg Infect Dis* 2018;24:762–766.
- Huang TD, Bogaerts P, Berhin C, *et al.* Increasing proportion of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and emergence of a MCR-1 producer through a multicentric study among hospital-based and private laboratories in Belgium from September to November 2015. *Euro Surveill* 2017;22: pii: 30530. doi: 10.2807/1560-7917.
- Pham Thanh D, Thanh Tuyen H, Nguyen Thi Nguyen T, *et al.* Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne *mcr-1* gene in a 2008 Vietnamese *Shigella sonnei* isolate. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:2314–2317.
- Terveer EM, Nijhuis RHT, Crobach MJT, *et al.* Prevalence of colistin resistance gene (*mcr-1*) containing *Enterobacteriaceae* in feces of patients attending a tertiary care hospital and detection of an *mcr-1*-containing, colistin-susceptible *E. coli*. *PLoS One* 2017;12: e0178598.
- Liassine N, Assouvie L, Descombes MC, *et al.* Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract *Enterobacteriaceae* in Switzerland. *Int J Infect Dis* 2016;51:4–5.

Manuscrito V - Detection of *Enterobacterales* resistant to Polymyxins using Rapid Polymyxins NP Test

Running title: Rapid phenotypic tests for polymyxins

Manuscrito submetido no periódico Brazilian Journal of Microbiology (ISSN 1678-4405) no formato de Short Communication.

Tanise Vendruscolo Dalmolin^{1,2,3}, Graziela Ávila Dias¹, Luiza Peres de Castro^{1,3}, Helena Ávila^{1,3}, Cibele Massotti Magagnin³, Alexandre Prehn Zavascki³, Daiana de Lima-Morales³ and Afonso Luís Barth^{1,2,3*}.

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

³Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana - LABRESIS, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

* Corresponding Author: Afonso L. Bath. Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil. Phone/fax: +55 (51) 33598607, e-mail: albarth@hcpa.edu.br

Abstract

Two hundred isolates of *Enterobacterales* were tested by Rapid Polymyxins NP in the detection of polymyxin resistance when compared to the reference test Broth Microdilution. The sensitivity and specificity of the NP test were 98% and the results are faster than the BMD, decreasing from approximately 24 hours to 2 hours.

Keywords: Polymyxins. Susceptibility. *Enterobacterales*. Rapid Polymyxins NP Test.

Polymyxins (polymyxin B and colistin) are last resort antimicrobial agents for the treatment of serious infections caused by multidrug resistant *Enterobacterales*, in particular carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE).¹

The main mechanisms related to acquired polymyxin resistance are associated to mutations in the regulatory systems that modify the lipopolysaccharide (LPS) of the bacterial outer membrane, resulting in a reduction in electrostatic interactions between the polymyxins and the bacterial membrane, triggering the resistance.^{2,3} Recently, Liu et al. (2016) described the first mobile polymyxin resistance mechanism, mediated by the gene *mcr-1* (mobile colistin resistance) located in a plasmid. The MCR-1 protein is a member of the phosphoethanolamine transferase family which promotes the addition of phosphoethanolamine to lipid A (lipopolysaccharide component) leading to a reduction of the the LPS affinity for polymyxins.⁴

The description of the *mcr-1* gene caused a great concern regarding its dissemination, among polymyxin susceptible *Enterobacterales*. Regardless of the resistance mechanism, the dissemination of polymyxin-resistant strains restricts the therapeutic options, leading to high mortality rates, therefore the development of fast and reliable methods that allow the detection of polymyxin resistance is needed. The usual routine microbiology susceptibility tests (disk diffusion and gradient diffusion test) are not reliable to evaluate the susceptibility to polymyxins. The fact that the only method considered accurate for the detection of resistance to polymyxins (the broth microdilution - BMD) is laborious and expensive, is another important reason for the development of fast and simple methods to detect polymyxin resistance.⁵⁻⁷

Recently Nordmann et al (2016) developed the Rapid Polymyxins NP Test. This test consists of detecting bacterial growth on glucose, in the presence of a defined concentration of polymyxin (polymyxin B or colistin). Growth of the bacteria in the presence of polymyxins will lead to glucose metabolism which will acidify the medium altering the pH, hence this change can be detected visually by a pH indicator color change. The final result of the Rapid Polymyxins NP test is obtained in up to 4 hours, although the majority of the resistant isolates present positive results in around 2 hours.⁷

The aim of this study was to assess the performance of the Rapid Polymyxins NP test in the detection of polymyxin resistance among isolates of *Enterobacterales* from human and animal source when compared to the reference test, the broth microdilution.

The Rapid Polymyxins NP test was evaluated with 200 isolates of *Enterobacterales* (100 resistant and 100 susceptible to the polymyxins by BMD) obtained from other surveillance studies between 2011 and 2017 in Southern Brazil. One hundred and eighty three isolates were from human origin⁸, 10 were from poultry slaughterhouse⁹, 4 from food-producing animals¹⁰ and 3 were transconjugants with the *mcr-1* gene¹¹⁻¹².

The resistant species to polymyxins (MICs 4 to >64µg/mL) included: 74 *Klebsiella pneumoniae*, 4 *Enterobacter* spp., 4 *E. coli* and 4 *Salmonella* spp. Additionally, isolates with intrinsic resistance to polymyxins (3 *Morganella morganii*, 1 *Proteus mirabilis*, 2 *Providencia rettgeri* and 8 *Serratia marcescens*) were also subjected to the test. The polymyxin-susceptible isolates (MICs ≤0.125 to 2µg/mL) included: 49 *Klebsiella* spp., 28 *E. coli*, 20 *Enterobacter* spp. and 3 *Citrobacter freundii*.

The bacterial DNA was extracted by thermal lysis and detection of the carbapenemases genes (*bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{GES}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48-like}* and *bla_{VIM}*)¹³ and the *mcr-1* gene⁴ was performed by a Multiplex Real-Time PCR, analyzed by HRM software.

The Rapid Polymyxins NP test was performed according to Nordmann et al. (2016b).⁷ The antibiotic solutions (polymyxin B and colistin at 0.2mg/mL) were mixed with the Rapid Polymyxin NP solution (2.5% of MHB-CA powder, 0.005% of phenol red indicator and 1% of D (+)-glucose) into sterile glass tubes in a proportion of 1:40. Given that, the final concentration containing colistin or polymyxin into tubes was 5µg/mL.⁷

The bacterial inoculum was standardized to obtain a 3.0–3.5 McFarland optical density (≈10⁹ CFU/ mL) in sterile solution of sodium chloride (NaCl) 0.85%. The test was performed in a 96-well polystyrene plate and for each isolate, 50µL of the bacterial suspension was inoculated in 3 wells: 1st well only 150µL of the Rapid Polymyxin NP solution (free of antibiotics), 2nd well 150µL of the Rapid Polymyxin NP solution with colistin; 3rd well 150µL of the Rapid Polymyxin NP solution with polymyxin B. The final concentration of bacteria was ≈10⁸ CFU/mL in each well, and the final concentration of colistin sulfate or polymyxin B were 3.75µg/mL.⁷

The plate was incubated for up to 4 h at $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and the first reading was made at 15 minutes and then every hour. The test was considered positive (polymyxin resistance) when the isolate grew in presence of colistin or polymyxin B, changing the color of the Rapid Polymyxin NP solution containing antibiotic from orange to yellow, i. e., the same color of the well containing only NP solution. However, the test was considered negative (polymyxin susceptible) when the isolate did not grow in the presence of antibiotics and the color of the solution remained orange.⁷

Enterobacterial isolates with minimal inhibitory concentration (MIC) for colistin and/or polymyxin B $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ were considered susceptible and those with MIC $>2 \mu\text{g/mL}$ were considered resistant according to Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST) guidelines¹⁴

From 100 resistant isolates by BMD, a total of 98 presented positive result in the Rapid Polymyxins NP test and only two isolates, both *K. pneumoniae* of human origin, KPC producers, with MIC of $4\mu\text{g/mL}$ and $32\mu\text{g/mL}$ by BMD, presented negative results in the Rapid Polymyxins NP test. Among the 100 susceptible polymyxins isolates by BMD, two *E. coli* isolates from poultry slaughterhouse presented positive results in the Rapid Polymyxins NP test; these isolates harbored the *mcr-1* gene, and presented MIC of $1\mu\text{g/mL}$ and $2\mu\text{g/mL}$ by BMD (Table 1).

In general, the time needed to the test to become positive was 2 hours (n=87), although 10 isolates turned positive in 1 hour and only 1 isolate needed 3 hours to become positive. The sensitivity and specificity of the Rapid Polymyxins NP test were 98%.

The Rapid Polymyxins NP test was easy to perform and considerably fast like other studies.^{5,7} Our findings confirm that the test produces results much faster than the BMD, which can contribute to the rapid identification of polymyxin resistant isolates. In addition, the test showed excellent sensitivity and specificity, similarly to the results found by Nordmann et al., (2016b)⁷, which reported 99.3% and 95.4% of sensitivity and specificity, respectively. Bakthavatchalam et al. (2017)¹⁶ also evaluated the Rapid Polymyxins NP test and found even higher levels (100%) of sensitivity and specificity.

Poirel (2018)¹⁷ found 100% sensitivity for the Rapid Polymyxins NP when it was performed with polymyxin resistance isolates mediated by plasmid carrying the

mcr-1 or *mcr-2* genes recovered from the environment, animals and human origin. On the other hand, we evaluated 19 isolates carrying *mcr-1* gene from animal and human origin (11 resistant to polymyxins and 8 susceptible) and the results were in agreement with the reference method (BMD), however 2 isolates harbouring *mcr-1* gene, but susceptible to polymyxins presented false-positive results.

The Rapid Polymyxins NP reported low sensitivity (25%) for polymyxins resistance detection in *Enterobacter* spp., probably due to heteroresistant phenomenon¹⁸. Unlikely, we did not have problems in detecting the susceptibility of *Enterobacter* spp. in our study.

The Rapid Polymyxins NP test showed excellent performance for the detection of resistant isolates and susceptible enterobacteria for either polymyxin B or colistin, when compared to the reference method. In fact, the Rapid Polymyxins NP test had no difference between the two antimicrobials tested. Additionally, the time needed to obtain the result reduce from approximately 24 hours (BMD test) to around 2 hours (Rapid Polymyxins NP test), besides, being less laborious. The rapid identification of polymyxin-resistant isolates may contribute for more precise therapy choices, as well as the rapid implementation of contact precaution measures, preventing the development of outbreaks with multidrug-resistant isolates.

Acknowledgments:

This work was supported by Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) (project no. 16-0559). T.V. D. and H.A. were supported by a grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—Brazil (CNPq).

References

1. Baughman RP. The Use of carbapenems in the treatment of serious infections. *J Intensive Care Med.* 2009; 24(4):230-241.
2. Leung LM, Cooper VS, Rasko DA, et al. Structural modification of LPS in colistin-resistant, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72(11): 3035-3042.

3. Velkov T, Deris ZZ, Huang ZX, et al. Surface changes and polymyxin interactions with a resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Innate Immun*. 20(4): 350-63.
4. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, 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*. 2016; 16(2):161–168.
5. Jayol A, Dubois V, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of polymyxin-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2016; 54(9):2273-2277.
6. Nordmann P, Poirel L. Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace. *Clin Microbiol Infect*. 2016a; 22(5):398-400.
7. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. 2016b; 22(6):1038-1043.
8. Rozales FP, Ribeiro VB, Magagnin CM, et al. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Porto Alegre, Brazil. *Int J Infect Dis*. 2014; 25:79-81.
9. Lentz SA, de Lima-Morales D, Cuppertino VM, et al. Letter to editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. *Euro Surveill*. 2016;21(26): 1-2.
10. Rau RB, de Lima-Morales D, Wink PL, Ribeiro AR, Martins AF, Barth AL. Emergence of *mcr-1* producing *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* from retail meat: first detection in Brazil. *Foodborne Pathog Dis*. 2018; 15(1):58-59.
11. Dalmolin TV, Martins AF, Zavascki AP, de Lima-Morales D, Barth AL. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018; 90(2):132-133.
12. Dalmolin TV, Castro L, Mayer FQ, et al. Co-occurrence of *mcr-1* and *bla*_{KPC-2} in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72(8):2404-2406.
13. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67:906-909.

14. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Versão 8.0. 2018.
15. Humphries RM. Susceptibility testing of the polymyxins: where are we now? *Pharmacotherapy*. 2015; 35(1):22–27.
16. Bakthavatchalam YD, Veeraraghavan B, Mathur P, Purighalla S, Richard VS. Polymyxin Nordmann/Poirel test for rapid detection of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*: Indian experience. *Indian J Med Microbiol*. 2016; 34: 564-565.
17. Poirel L, Larpin Y, Dobias J, et al. Rapid Polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance mediated by the *mcr-1/mcr-2* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018; 90 (1): 7-10.
18. Simar S, Sibley D, Ashcraft D, Pankey G. Evaluation of the rapid polymyxin NP test for polymyxin B resistance detection using *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes* isolates. *J Clin Microbiol*. 2017;55(10):3016-3020.

Table 1. Rapid Polymyxins NP Test Results among *Enterobacterales isolates*

	Susceptibility to Polymyxins	Isolates	NP Polymyxin Test	Sensitivity and Specificity of NP Polymyxin Test
<i>K. pneumoniae</i> (121 isolates – 60.5%)	Resistant ^{ab}	74 (37%)	72 positive result and 2 negative results	97.3% and 100%
	Susceptible	47 (23.5%)	47 negative results	
<i>E. coli</i> (32 isolates – 16%)	Resistant ^b	4 (2%)	4 positive results	100% and 92.86%
	Susceptible	28 (14%)	26 negative results and 2 positive results	
<i>Enterobacter spp.</i> (24 isolates – 12%)	Resistant ^a	4 (2%)	4 positive results	100%
	Susceptible	20 (10%)	20 negative results	
<i>S. marcescens</i> (8 isolates – 4%)	Resistant ^c	8 (4%)	8 positive results	Sensitivity 100%
<i>Salmonella spp.</i> (4 isolates – 2%)	Resistant ^b	4 (2%)	4 positive results	Sensitivity 100%
<i>C. freundii</i> (3 isolates – 1.5%)	Susceptible	3 (1.5%)	3 negative results (100%)	Specificity 100%
<i>M. morgamii</i> (3 isolates – 1.5%)	Resistant ^c	3 (1.5%)	3 positive results (100%)	Sensitivity 100%
<i>K. oxytoca</i> (2 isolates – 1%)	Susceptible	2 (1%)	2 negative results (100%)	Specificity 100%
<i>P. rettgeri</i> (2 isolates – 1%)	Resistant ^c	2 (1%)	2 positive results (100%)	Sensitivity 100%
<i>P. mirabilis</i> (1 isolates – 0.5%)	Resistant ^c	1 (0.5%)	1 positive results (100%)	Sensitivity 100%

^a Chromosomal resistance mechanism not evaluated; ^b Plasmidial Resistance and ^c Intrinsic resistance.

Manuscrito VI – Evaluation of commercial tests for the detection of the susceptibility to polymyxins

Manuscrito a ser submetido ao Journal of Microbiological Methods (ISSN: 0167-7012) no formato de Full Length Original Research Articles.

Tanise Vendruscolo Dalmolin^{1,2} Luíza Peres de Castro^{1,3}, Daiana de Lima Morales¹; Afonso Luís Barth^{1,2,3*}

¹Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana - LABRESIS, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

³Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

* Corresponding Author: Phone: (+55) 51 3359-8607. E-mail: albarth@hcpa.edu.br

Abstract

Polymyxins resistance is an emerging problem and it has been increasing worldwide. The reference method for determining bacterial susceptibility to polymyxins is the broth microdilution (BMD); however it is a laborious and time consuming procedure. For this reason, this study aims to analyze the performance of the Policimbac® and Superpolymyxin® agar comparing to the BMD. A total of 112 isolates (51 resistant and 61 susceptible to colistin by BMD) were evaluated. Policimbac® test consists in a commercial panel with lyophilized Polymyxin B antibiotic and determines the minimum inhibitory concentration (MIC) of the Gram-negative isolate. Superpolymyxin medium is a selective medium which was developed for the screening of colistin resistance Gram-negative bacteria. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the Policimbac® test were 98%, 77%, 78.1 % and 97.9%, respectively, while the Superpolymyxin® agar presented sensitivity, specificity, PPV and NPV of 94.1%, 75.4%, 76.2 and 93.9%, respectively. Policimbac® test and the Superpolymyxin®

agar when compared to BMD presented efficient results for polymyxins resistant isolates, however for polymyxin susceptible isolates the test did not show satisfactory specificity and PPV results, being necessary to confirm the results of the Policimbac® test and the Superpolymyxin® agar with BMD method.

Keywords: Polymyxins. Policimbac®. Superpolymyxin® agar.

Introduction

Carbapenems are considered the treatment of choice for serious infections caused by Gram-negative bacteria. However the increasing use of this class of antibiotics worldwide is associated to antibiotic resistance. The polymyxins (polymyxin B and colistin) are the one of the last resort for the treatment of infections caused by carbapenem resistant bacteria (Falagas et al., 2005; Lee et al., 2009; Nordmann et al., 2016a; Rahal, 2008).

Polymyxins resistance is an emerging problem increased by the report of the transferable colistin resistance mediated by plasmid carrying the *mcr-1* gene in human and animal isolates of *Enterobacterales*, in November 2015 (Giamarellou, 2016; Liu et al., 2016). The *mcr-1* gene has been described in several countries, including Brazil (Conceição-Neto et al., 2017; Dalmolin et al., 2017).

The reference method for determining bacterial susceptibility to polymyxins is the broth microdilution (BMD), however it is a laborious technique and time consuming procedure that requires material not often found in routine laboratory. For this reason commercial products have been developed to evaluate the susceptibility to polymyxins (Poirel et al., 2017).

The Policimbac® (Probac do Brasil) evaluates the minimum inhibitory concentration (MIC) of the Gram-negative isolate in a commercial panel with lyophilized Polymyxin B.

Another commercial product is the Superpolymyxin medium, which was developed for the screening of colistin resistance Gram-negative bacteria. Superpolymyxin medium is a selective medium based on the eosin methylene blue (EMB) broth, which is selective for Gram-negative bacteria. It was formulated to prevent contamination by *Streptococcus* sp. and *Staphylococcus* sp. (10 µg/mL of the

daptomycin), fungi (5 µg/mL of the amphotericin B) and to detect Gram-negative bacteria with a reduced susceptibility to polymyxins (3.5 µg/mL of the colistin) (Nordmann et al., 2016b).

Due to the urgent need for reliable tests for the detection of polymyxins resistance, this study aims to analyze the performance of the Policimbac® and Superpolymyxin® agar (Plast Labor) comparing to the reference method (BMD).

Materials and Methods

Isolates

To evaluate the performance of the Policimbac® and Superpolymyxins® agar, we used a total of 112 Gram-negative isolates (50 *Klebsiella* sp., 18 *Enterobacter* sp., 17 *Acinetobacter* sp., 9 *Escherichia coli*, 6 *Pseudomonas aeruginosa*, 6 *Serratia marcescens*, 3 *Citrobacter freundii*, 2 *Morganella morganii* and 1 *Providencia rettgeri*) collected from surveillance studies in southern Brazil, between 2013 and 2016, from animal and human origin (Lentz et al., 2016; Rozales et al., 2014).

Antimicrobial susceptibility testing

To determine MICs for polymyxins, we used the BMD method in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (MHB-CA). The results were interpreted using the breakpoints of the Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). Enterobacterial isolates with colistin or polymyxin B MICs $\leq 2\mu\text{g/mL}$ were considered susceptible and with MICs $>2\mu\text{g/mL}$ were considered resistant (BrCAST, 2018).

Policimbac®

Policimbac® (Probac) test consists in a panel of twelve wells, for each isolate to be tested. Wells from 1 to 10 contain dehydrated cation-adjusted Mueller-Hinton broth with decreasing concentrations of the lyophilized antibiotic polymyxin B (64 to 0.125 µg/mL). The well 11 was established as the positive control (only bacterial inoculum) and the well 12 is the negative control (only NaCl).

Three glass tubes were used for each isolate: Tube 1 contained standardized enterobacterial inoculum 0.5 McFarland made with fresh overnight bacterial culture obtained from Mueller-Hinton plates; Tube 2: contained a 100-fold dilutions from the tube 1 (50 μ L solution of tube 1 + 4,950 mL of the NaCl 0.9% solution), resulting in a suspension of the 10⁶ CFU/mL; Tube 3: contained a 10-fold dilution of Tube 2 (500 μ L solution of tube 2 + 4,500 mL of the NaCl 0.9% solution), resulting in a suspension of the 10⁵ CFU/mL (Probac, 2018).

A volume of 100 μ L from Tube 3 was added to the wells 1 to 11 of the Policimbac® test panel, which were incubated for 24 hours in ambient air at 35 \pm 2°C. After incubation, one drop of revealing solution was added to each well, in order to better visualize the results. Bacterial growth was indicated when the revealing solution turned to red after incubation for 20 minutes at 35 \pm 2°C. The MIC value was defined as the lowest antibiotic concentration that inhibit the visible growth of a isolate. MIC for Polymyxin B \leq 2 μ g/mL were considered susceptible and MIC >2 μ g/mL were considered resistant (BrCAST, 2018).

Superpolymyxin® agar

A volume of 10 μ L of inoculum of 0.5 McFarland (inoculum of 1x10⁸ CFU/mL) was plated onto the Superpolymyxin® agar (Plast Labor), resulting in a concentration of the 10⁶ CFU/spot. The plates were incubated for 24 hours at 35° \pm 2°C. If the bacterial growth was observed, the isolate was considered resistant to colistin and the absense of growth indicates susceptible to colistin. When the result was not in agreement with the reference method (BMD), the test was repeated with a lower bacterial inoculum (10³ CFU/spot).

Results

A total of 112 isolates, 51 isolates resistant to colistin (MIC from 4 to >64 μ g/mL) and 61 susceptible to colistin (MICs \leq 0,125 to 2 μ g/mL) by BMD were evaluated. The resistant isolates included: 9 isolates with intrinsic resistance to polymyxins (6 *S. marcescens*, 2 *M. morgani* and 1 *P. rettgeri*), 39 isolates which

belonged to *Enterobacterales* (31 *Klebsiella* sp., 7 *Enterobacter* sp. and 1 *E. coli*) and 3 non-fermenters (2 *Acinetobacter* sp. and 1 *P. aeruginosa*).

Among susceptible isolates, 41 isolates belonged to *Enterobacterales* (19 *Klebsiella* sp., 11 *Enterobacter* sp., 8 *E. coli*, 3 *C. freundii*), 15 *Acinetobacter* sp. and 5 *P. aeruginosa*.

All resistant isolates according to the BMD method presented the same profile in the Policimbac® test, except for one isolate of the *Acinetobacter* sp., which presented MIC 4µg/mL in the BMD method and MIC ≤0,125µg/mL in the Policimbac® test. The result was considered a false negative of Policimbac® test.

Regarding the susceptible isolates, 47 results of the Policimbac® test were in agreement with the BMD method. However, 14 isolates (11 *Klebsiella* sp. and 3 *Enterobacter* sp.) presented false positive results (false resistance). The MIC values of these isolates were between ≤0,125µg/mL to 2µg/mL according to BMD method and in the Policimbac® test they presented MIC values between 4 to >64µg/mL.

The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the Policimbac® test were 98%, 77%, 78.1 % and 97.9%, respectively. The figure 1 shows the correlation between the MICs obtained by the BMD method and Policimbac® test.

		Polymyxins reference MIC (µg/mL) (reference method)											
		≤0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
MIC (µg/mL) by Policimbac® test	≤0,125	2 ^a					1 ^b						
	0,25	4 ^c		2									
	0,5	5	5	1									
	1	5	3	2	1	2							
	2	6	5	1	2	1							
	4		5				1	1					
	8			3	1	1				1			
	16	1		2			2	1	1		1		
	32								2				
	64									2		1	
	>64					1	1	1	5	9	11	9	

Figure 1. Correlation of polymyxins MIC values between Policimbac® test and reference method.

^a MIC identical with MIC by reference method are highlighted in green.

^b Red numbers showed the results that presented disagreement in the resistant/susceptible categorial.

^c Black numbers showed the results with categorial agreement, although do not presenting essential agreement.

All 112 isolates were also evaluated by the Superpolymyxin® agar and 3 isolates resistant to polymyxins (2 *Klebsiella* sp. and 1 *Acinetobacter* sp.) did not grow in the medium (false negative result), they presented polymyxin MIC 16µg/mL, 8µg/mL and 4µg/mL, respectively.

Among the susceptible isolates by BMD method, 10 *Klebsiella* sp. isolates, 4 *Acinetobacter* sp. and 1 *Enterobacter* sp. grew on the Superpolymyxin® agar (false positives). Of these, 8 *Klebsiella* sp. isolates were also considered susceptible by the Policimbac® test. We repeated the Superpolymyxin® agar test with a lower final concentration (10^3 CFU/spot) to the isolates that present discrepant results. From the 15 isolates previously considered to be resistant according to the test, 11 isolates (3 *P. aeruginosa*, 4 *Acinetobacter* spp. and 4 enterobacterial), after the concentration modification were considered susceptible. Therefore, this methodology may be considered dependent of the inoculum concentration.

The Superpolymyxin® agar presented sensitivity, specificity, PPV and NPV of 94.1%, 75.4%, 76.2 and 93.9%, respectively.

Discussion

Policimbac® is considered less labourious method to determine polymyxin susceptibility, since the antibiotic is already distributed on the panel. In addition, the result observation is simplified by the use of reveling solution. In the literature there are no studies about the performance of Policimbac®. In our study the major disagreement occurred among 14 susceptible isolates according to the reference method (BMD) which were considered resistant by the commercial test (low specificity value – 77%).

The low specificity value of the Policimbac® test can be explained because polymyxins have the ability to bind to the microtiter plates (Poirel et al., 2017). This binding may contribute for a possible decreased in antibiotic concentration, resulting in false resistant result. The plates used for the reference method are also polystyrene, however the period of time that polymyxins are in contact with the plates is shorter (around 24 hours) if compared to the plates of the Policimbac® (1-2 months).

In addition, in Policimbac® protocol there are no homogenization step after bacterial suspension is added in the wells. Therefore, the polymyxin B may not be fully resuspended and the concentration may be lower than expected, resulting in false positive isolates. Another important variable that should be considered is the temperature of storage of the Policimbac® plates (2 to 8°C). If the plates are not stored in the right temperature, the antibiotic can be degraded, decreasing its concentration in each well.

Regarding the Superpolymyxin® agar, this test could be an efficient methodology for screening resistant polymyxin isolates, since it is easy to perform and to interpret. In our study, the major disagreement in results were among 15 isolates considered resistant by Superpolymyxin® agar and susceptible according to reference method.

Studies evaluating Superpolymyxin® agar showed sensitivity and specificity of 100%, however those studies used different concentrations of the inoculum (Bardet et al., 2017; Nordmann et al., 2016b). In our study, we evaluated the final concentration of 1×10^6 CFU/mL, because it is the standard dilution used in routine laboratory (10µL of the 0.5 McFarland scale).

Abdul Momim et al (2017) tested Superpolymyxin® agar and reported only 2 false negative results (*A. baumannii* MIC 8µg/mL and *Stenotrophomonas maltophilia* MIC 32 µg/mL). In our study we reported 1 *Acinetobacter* sp. isolate with false negative results. We can speculate that this bacterial genus (*Acinetobacter*) can present synergism between colistin and daptomycin (Phee et al., 2013).

Conclusion

Policimbac® test and the Superpolymyxin® agar when compared to the reference method (BMD) are useful for the detection of susceptibility to polymyxins. Both methods presented efficient results for polymyxins resistant isolates, however for polymyxin susceptible isolates the tests did not show satisfactory specificity and PPV results. Thus, it is necessary to confirm the resistance results of the Policimbac® test and the Superpolymyxin® agar with BMD method, or improve both techniques to have a better specificity.

References

1. Abdul Momin, M.H.F., Bean, D.C., Hendriksen, R.S., et al., 2017. CHROMagar COL-APSE: a selective bacterial culture medium for the isolation and differentiation of colistin-resistant Gram-negative pathogens. *J. Med. Microbiol.* 66, 1554-1561.
2. Bardet, L., Le Page, S., Leangapichart, T., et al., 2017. LBJMR medium: a new polyvalent culture medium for isolating and selecting vancomycin and colistin-resistant bacteria. *BMC Microbiol.* 17, 1-10.
3. Conceição-Neto, O.C., Aires, C.A.M., Pereira, N.F., et al., 2017. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 50, 282-284.
4. Dalmolin, T.V., Castro, L., Mayer, F.Q., et al., 2017. Co-occurrence of *mcr-1* and *bla*_{KPC-2} in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J. Antim. Chem.* 72, 2404-2406.
5. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. BrCAST 2018: Version 8.0
6. Falagas, M.E., Kasiakou, S.K., Saravolatz, L.D., 2005. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin. Infec. Dis.* 40, 1333-1341.
7. Giamarellou, H., 2016. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 48, 614-621.
8. Lee, J., Patel, G., Huprikar, S., et al., 2009. Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1611-1612.
9. Lentz, S.A., de Lima-Morales, D., Cuppertino, V.M., et al., 2016. Letter to editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. *Euro Surveill.* 21, 1-2.
10. Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., et al., 2016. 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, 161-168.
11. Nordmann, P., Jayol, A., Poirel, L., 2016a. Rapid detection of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1038-1043.
 12. Nordmann, P., Jayol, A., Poirel, L., 2016b. A universal culture medium for screening polymyxin-resistant Gram-negative isolates. *J. Clin. Microbiol.* 54, 1395-1399.
 13. Phee, L., Hornsey, M., Wareham, D.W., 2013. In vitro activity of daptomycin in combination with low-dose colistin against a diverse collection of Gram-negative bacterial pathogens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 1219-1294.
 14. Poirel, L., Jayol, A., Nordmann, P., 2017. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 557-596.
 15. PLAST LABOR. Ágar SuperPolimixinas®. Disponível em: <https://www.plastlabor.com.br/produtos-diagnostico/meios-de-cultura-em-placas/meio-de-cultura-%C3%81gar-super-polimixina-90x15mm/4-3497>. Acesso em 09 de outubro de 2018.
 16. PROBAC. Policimbac®. Disponível em: <http://www.probac.com.br/Anexos/Bulas/Meios%20Susceptibilidade/Policimbac%20-%20Rev%2000.pdf>>. Acesso em: 10 de outubro de 2018.
 17. Rahal, J.J., 2008. The role of carbapenems in initial therapy for serious Gram-negative infections. *Crit. Care.* 12, S5.
 18. Rozales, F.P., Ribeiro, V.B., Magagnin, C.M., et al., 2014. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Porto Alegre, Brazil. *Int. J. Infect. Dis.* 25, 79-81.

Manuscrito VII – Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods

Manuscrito a ser submetido ao Journal of Microbiological Methods (ISSN: 0167-7012) no formato de Full Length Original Research Articles.

Tanise Vendruscolo Dalmolin^{1,2§}; Alana Mazzetti^{3§}; Helena Ávila¹; Daiana de Lima Morales¹; Afonso Luís Barth^{1,2}; Marcelo Pillonetto³

¹ LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Programa De Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³ LACEN/PR - Laboratório Central do Paraná, São José dos Pinhais – PR, Brazil.

§: Both authors contributed equally to this work.

Abstract

The emergence of polymyxin resistant bacteria is a growing concern. The Broth Microdilution (BMD) is the reference method to evaluate the polymyxins susceptibility. However the BMD is a laborious test to be performed in routine laboratories, which requires the pure salts of the antibiotics (of considerable high cost). A new approach to evaluate the polymyxins susceptibility, the Colistin Broth Disk Elution (CBDE) test, uses colistin disks as a source of these antibiotics which are added to Cation -Adjusted Mueller Hinton broth. The aim of this study was to evaluate the performance of two protocols which used diminished volumes of the reagents of CBDE: the Colistin Broth Microelution - CBM (final volume of 1mL) and the Microelution-Plates Test – MPT (final volume of 200µL) in comparison to the BMD reference method. We also aimed to evaluate the Colistin Susceptibility Test Tube - CSTT, which uses only one tube containing 5mL of CA-MHB added of 1 colistin disk (10µg). The tests were performed with 85 Gram-negative isolates collected from surveillance studies. The CBM, MPT and CSTT tests presented a good Categorical Agreement (CA), Essential Agreement (EA), sensitivity and specificity to

Enterobacterales isolates (91.18%, 95.59%, 95.35% and 84%, respectively to CBM; 85.29%, 98.53%, 88,37% and 80%, respectively to MPT; 91.18%; not applicable, 93.02% and 88%, respectively to CSTT), however the ME and VME were less satisfactory (16% and 4.65% to CBM; 20% and 11.63% to MPT; 12% and 6.98% to CSTT). The results for non-fermentative isolates were not satisfactory, with low CA, EA, sensitivity and specificity (76.47%, 82.35%, 87.5% and 66.67% to CBM; 76.47%, 76.47%, 75% and 77.78% to MPT; 82.35%, not applicable; 62.5% and 100% to CSTT) and high ME and VME (33.33% and 12.5% to CBM; 22.22% and 25% to MPT; 0 and 37.5% to CSTT). In conclusion, the proposed methods, mainly the CSTT, can be used as screening tests to detect colistin resistance among *Enterobacterales* as they are an easy and inexpensive option for the BMD.

Keywords: Antibiotic Resistance. Elution. Colistin.

Introduction

Multi-drug resistant (MDR) microorganisms, in particular the carbapenem resistant *Enterobacterales* (CRE), are being increasingly reported in clinical isolates worldwide. Infections caused by MDR bacteria are difficult to treat and limited options are available (Jayol et al., 2018; Poirel et al., 2017). For this reason the polymyxins (Polymyxin B and Polymyxin E or colistin) are antimicrobials considered the last resource against MDR Gram-negative (Pillonetto et al., 2018).

Until recently, polymyxin resistance was related to chromosomal mutations, which lead to modification of the bacterial lipopolysaccharide, decreasing the affinity for the polymyxins. However, in November 2015, Liu and colleagues reported, for the first time, the transferable colistin resistance mediated by the *mcr-1* gene (Liu et al., 2016). The *mcr-1* gene was identified in human, animal and environmental isolates of *Enterobacterales* and the great concern is the co-production of the *mcr-1* gene with CRE (Dalmolin et al., 2017) which can lead to pan-drug-resistant isolates.

The increased use of polymyxins in the clinical practice is a growing concern, as it may play a role in the emergence of polymyxins resistant bacteria (Singhal et al., 2018). Given the current situation, the need for reliable methods for polymyxins susceptibility testing is rising.

Broth microdilution (BMD) is the reference method to establish the minimum inhibitory concentration (MIC) of polymyxins according to a joint recommendation by CLSI and EUCAST released in 2016 (Chew et al., 2017). The BMD is, however, a laborious and costly technique to perform in routine laboratories (Nordmann et al., 2016). It has to be considered that the BMD method may present non reliable results due to the adherence of the colistin molecule to the plastic surface of polystyrene plates (Singhal et al., 2018). Other methods used to evaluate polymyxins susceptibility such as agar dilution, disk diffusion, and gradient concentration are not recommended (Chew et al., 2017).

Therefore, the development of reliable techniques for the detection of polymyxin resistance, with low cost and feasibility is necessary.

In October 2018, Simner and colleagues described the Colistin Broth Disk Elution (CBDE). This test consists of the evaluation of colistin susceptibility using 4 tubes with a final concentration of 0 (growth control), 1, 2 and 4 μ g/mL of colistin. The concentration of colistin is obtained by the addition of colistin disks 10 μ g (0, 1, 2 and 4 disks, respectively) to the 10mL of the Cation -Adjusted Mueller Hinton broth. After incubation (16-20 hours) at 35°C the colistin MIC values were read by visual inspection.

The aim of this study was to evaluate the performance of protocol using diminished volumes of the CBDE reagents: the Colistin Broth Microelution - CBM (final volume of 1mL) and the Microelution-Plates Test – MPT (final volume of 200 μ L) in comparison to the BMD reference method. We also aimed to evaluate the qualitative test (Colistin Susceptibility Test Tube- CSTT) to determine colistin susceptibility.

Materials and Methods

Isolates

The tests were performed with 85 Gram-negative rods obtained from surveillance studies of two different research centers in Brazil (Laboratório Central do Paraná - LACEN/PR and Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana - LABRESIS/RS), between 2013 and 2017. The isolates used in this study were

obtained from four Brazilian states: three located in the south (29 isolates from Rio Grande do Sul, 1 isolate from Santa Catarina and 53 isolates from Paraná) and one in Central-West (2 isolates from Mato Grosso). The isolates were from animal and human origins and included 68 *Enterobacterales* (37 *Klebsiella* sp., 17 *Escherichia coli*, 7 *Enterobacter* sp., 1 *Hafnia alvei*, 1 *Morganella morganii*, 1 *Providencia rettgeri*, 3 *Serratia marcescens* and 1 *Citrobacter freundii*) and 18 non-fermentative Gram-negative rods (9 *Acinetobacter baumannii* and 8 *Pseudomonas aeruginosa*).

Broth Microdilution Method

The susceptibility of colistin was performed by the broth microdilution (BMD) in Cation-Adjusted Mueller Hinton Broth (CA-MHB). The results were interpreted using the breakpoints of the Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). Isolates with colistin minimal inhibitory concentration (MIC) ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ were considered susceptible and with MIC > 2 $\mu\text{g/mL}$ were considered resistant (BrCAST, 2018).

Colistin Broth Microelution (CBM) and the Microelution-Plates Test (MPT)

To perform the CBM and MPT tests, 3 tubes with 10mL of CA-MHB were prepared per isolate and colistin disks (10 μg) (Oxoid®) were added as follow: one tube without disk (growth control), one disk in tube 1, two in tube 2 and four in tube 3 resulting in a final concentration of 0, 1, 2 and 4 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Colistin was allowed to elute from the disks at room temperature for 60 minutes.

The bacterium inoculum was prepared by suspending fresh colonies in sterile saline and adjusting turbidity to McFarland 0.5 standard ($\sim 10^8$ CFU/mL). The CA-MHB solution with colistin eluted was fractionated in tubes (1mL) for the CBM test. A volume of 5 μl of the bacterial suspension was added to each tube containing 1, 2, 4 $\mu\text{g/mL}$ of the antibiotics and the growth control. All tubes were gently mixed and incubated during 16-20 hour at 35°C. The MIC results were determined by visual inspection of the tubes.

For the MPT test, the CA-MHB solution with eluted colistin was fractionated in microtiter plates using 200 μL in each well in order to obtain the following concentrations: 0, 1, 2 and 4 $\mu\text{g/mL}$. A volume of 3 μL of the bacterium inoculum was

added in each well containing the antibiotics and the growth control. The tubes were mixed and incubated for 16-20 hours at 35°C before reading.

Colistin Susceptibility Test Tube (CSTT)

The CSTT was performed with one tube containing 5mL of CA-MHB and 1 colistin disk (10µg) to give a final concentration of 2µg/mL. After 60 minutes of incubation at room temperature (for colistin disk elution), an aliquot with 25µL of the bacterium inoculum (10⁸ CFU/mL) was added to the tube. Tubes were incubated for 16-20 hours at 35°C in ambient air and the isolate was considered resistant (MIC colistin >2µg/mL) when bacterial growth (turbidity) was observed (BrCAST, 2018).

Statistical Analysis

The essential agreement - EA (percentage of isolates with MICs within ± 1 dilution of the reference method BMD) and the categorical agreement - CA (percentage of isolates with the same category result - susceptible/resistant - as compared to the reference method BMD) were evaluated for CBM, MPT and CSTT tests and the results were considered acceptable whether CA and EA were $\geq 90\%$ (ISO, 2007). Moreover, the Major Errors - ME (resistant by the new methods and susceptible by the reference method) and Very Major Errors - VME (susceptible by the new method and resistant by reference method) were evaluated and the results were considered acceptable whether the VME and ME were $\leq 3\%$ defined by the ISO standards (ISO, 2007).

Results

Among the 85 isolates, 34 were susceptible (MICs ≤ 1 to 2µg/mL) and 51 were resistant (MIC from 4 to >32µg/mL) to polymyxins according to the reference technique. The susceptible isolates included 25 *Enterobacterales* (10 *Klebsiella* sp., 9 *E. coli*, 5 *Enterobacter* sp. and 1 *C. freundii*) and 9 non-fermenters (6 *P. aeruginosa* and 3 *Acinetobacter* sp.).

Among the resistant isolates: 43 belonged to *Enterobacterales* (27 *Klebsiella* sp., 8 *E. coli*, 3 *S. marcescens*, 2 *Enterobacter* sp., 1 *H. alvei*, 1 *M. morgani* and 1 *P. rettgeri*) and 8 were non-fermenters (6 *Acinetobacter* sp. and 2 *P. aeruginosa*).

All 51 resistant isolates according to the BMD method presented the same profile in the CBM test, except for three isolates; one *Klebsiella* sp., one *H. alvei* and one *Acinetobacter* sp. which presented MIC 4 μ g/mL in the BMD method and MIC \leq 1, 2 and 2 μ g/mL in the CBM test, respectively. Seven susceptible isolates according to BMD (3 *E. coli* with MIC 2 μ g/mL, 2 *P. aeruginosa* with MIC \leq 1 μ g/mL, 1 *A. baumannii* with MIC \leq 1 μ g/mL and 1 *Klebsiella* sp. with MIC \leq 1 μ g/mL) presented resistance results in the CBM (Table 1).

The MPT test showed fourteen categorical disagreement results: seven resistant isolates (4 *E. coli*, 2 *Acinetobacter* sp. and 1 *Klebsiella* sp.) according to BMD were susceptible in the MPT, as well as seven susceptible isolates (4 *E. coli*, 2 *P. aeruginosa* and 1 *Klebsiella* sp.) according to BMD, were resistant in the MPT (Table 2).

The CSTT test showed nine categorical disagreement results: six isolates (MIC 4 μ g/mL: 2 *E. coli*, 2 *Acinetobacter* sp., 1 *Klebsiella* sp. and 1 *P. aeruginosa*) were resistant according to BMD and susceptible according to CSTT, as well as three isolates (2 *E. coli* with MIC 2 μ g/mL and 1 *Klebsiella* sp. with MIC \leq 0.5 μ g/mL) were susceptible according to BMD and resistant according to CSTT (Table 3).

The CA, EA, VME, ME, Sensitivity and Specificity of the tests were summarized in Table 4.

Discussion

BMD is the reference method for MIC determination to polymyxins, however this technique may be troublesome, the polymyxins can adhere to the plastic surface of polystyrene plates. Moreover, the BMD is laborious, expensive and time consuming (Poirel et al., 2017; Singhal et al., 2018). The poor performance of disk and gradient diffusion methods for polymyxins susceptibility tests showed high levels of false susceptibility and are considered unreliable to evaluate the susceptibility of polymyxins (Chew et al., 2017; Dafopoulou et al., 2015; Hindler; Humphries, 2014; Liu et al 2015).

The development of fast and simple methods to detect polymyxin resistance is necessary. Nordmann et al (2016) developed the Rapid Polymyxins NP Test, which

consists of detecting polymyxin resistance in *Enterobacterales* through the bacterial growth on glucose, in the presence of a defined concentration of polymyxin. When the growth of the bacteria in the presence of polymyxins (resistance isolate) occurs, it will acidify the medium which will change the color of the pH indicator. Moreover the result of the test is obtained in up to 4 hours and this is a major advantage in relation to the BMD. However, the NP test was not evaluated for bacteria with different metabolic pathways of those of *Enterobacterales*, such as non-fermentative rods (Nordmann et al., 2016). The elution methods evaluated in this study could be used for non-fermentative bacteria, since these tests do not use the fermentative characteristic to evaluate the resistance to polymyxins.

The polycationic nature of polymyxins can cause adhesion to a wide range of materials, including plastics (Karvanen et al., 2017), causing great concern about the possibility of incorrect MIC results, therefore ways to overcome this adhesion have been studied (Poirel et al., 2017; Singhal et al., 2018). Among the options to decrease this adhesion is the use of surfactant however, the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommended broth microdilution, without surfactant, as the reference method for testing colistin, because the surfactant has some antibacterial activity and may act synergistically with polymyxins (Chew et al., 2018; CLSI, 2018). An alternative is the use of glass instead of plastic to prevent polymyxins binding (Singhal et al., 2018). The elution methods CBDE test, such as CBM and CSTT were proposed using glass tubes to avoid polymyxin binding.

The CBM, MPT and CSTT tests presented a good CA, EA, sensitivity and specificity considering the *Enterobacterales*, however the ME and VME were less satisfactory. In fact, the majority of the isolates with discrepant result in the elution methods presented MIC by BMD near to the breakpoint values (2 and 4 μ g/mL) to polymyxins. In fact, the elution methods, in particular the CBM and the CSTT which presented the highest sensitivity, may be interesting screening tests to evaluate the susceptibility of *Enterobacterales* to polymyxins in the routine laboratories.

The results for non-fermentative isolates were not satisfactory, with low CA, EA, sensitivity and specificity and high ME and VME. This indicates that the elution methods are not reliable to evaluate the susceptibility to polymyxins although the

number of non-fermentative isolates evaluated in this study was restricted. In fact, the small number of non-fermentative isolates is a limitation of our study.

In addition, the concentration of colistin eluted from the disks in the broth medium was assumed but not confirmed by other analytical method. Colistin concentrations different than the expected could explain the high ME and VME values. Therefore, further studies monitoring the polymyxin concentration in the broth medium post elution are warranted.

In summary, the elution methods evaluated in this study (CBM, MPT and CSTT) proved to be easily performed using readily available and affordable supplies from routine laboratories. Moreover, they could be used as screening test, in particular the CBM and the CSTT, as only resistant isolates would need further test with the BMD reference method. The CSTT is the easiest and inexpensive option to perform the screening of isolates since many laboratories do not have the necessary materials to perform the BMD.

References:

1. Chew, K.L., La, M.V., LIN, R.T.P, et al., 2017. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and *mcr*-positive *Enterobacteriaceae*: comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *J. Clin. Microbiol.* 55(9): 2609–2616.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Eighth Informational Supplement.
3. Dafopoulou, K., Zarkotou, O., Dimitroulia, E., et al., 2015. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem non susceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59: 4625–4630.
4. Dalmolin, T.V., Castro, L., Mayer, F.Q., et al., 2017. Co-occurrence of *mcr-1* and *bla*_{KPC-2} in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.* 72(8): 2404–2406.

5. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. BrCAST 2018: Version 8.0
6. Hindler, J.A., Humphries, R.M. 2013. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical 282 isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 51: 1678-1684.
7. International Standard Organization. Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices – Part 2: evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. International Standard ISO 20776-2:2007, Geneva: ISO, 2007.
8. Jayol A., Nordmann, P., André, C., et al., 2018. Evaluation of three broth microdilution systems to determine colistin susceptibility of Gram-negative bacilli. *J. Antimicrob. Chemother.* 73(5):1272–1278.
9. Karvanem, M., Malmberg, C., Lagerback, P., et al., 2017. Colistin is extensively lost during standard *in vitro* experimental conditions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61(11): pii: e00857-17.
10. Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., et al., 2016. 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): 161–168.
11. Nordmann, P., Jayol, A., Poirel, L., et al., 2016. Rapid detection of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* 22(6): 1038–1043.
12. Pillonetto, M., Mazzetti, A., Becker, G.N., et al., 2018. Low level of polymyxin resistance among non-clonal *mcr-1*-positive *Escherichia coli* from human sources in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect Dis.* In press.
13. Poirel, L., Jayol, A., Nordmann, P., et al., 2017. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* 30: 557–596.
14. Simner, P.J., Bergman, Y., Trejo, M., et al., 2018. Two-site evaluation of the colistin broth disk elution test to determine colistin *in vitro* activity against Gram-

negative bacilli. J. Clin. Microbiol. In Press.

15. Singhal, L., Sharma, M., Verma, S., et al., 2018. Comparative evaluation of broth microdilution with polystyrene and glass-coated plates, agar dilution, e-test, vitek, and disk diffusion for susceptibility testing of colistin and polymyxin B on carbapenem-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Microb. Drug Resist. 24(8): 1082-1088.

Table 1. Polymyxins reference MIC ($\mu\text{g/mL}$) (reference method) x CBM test

		a. <i>Enterobacteriales</i> BMD MIC ($\mu\text{g/mL}$)						b. Non-fermentative BMD MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
		≤ 1	2	4	>4			≤ 1	2	4	>4
CBM MIC ($\mu\text{g/mL}$)	≤ 1	15	1	1		CBM MIC ($\mu\text{g/mL}$)	≤ 1	1	1		
	2	3	2	1			2	4		1	
	4		2	4	1		4			2	
	>4	1	1	3	33		>4	3			5

MIC identical with MIC by standard method highlighted in grey.
Blue numbers showed the results that presented Major Errors (ME).
Red numbers showed the results that presented Very Major Errors (VME).

Table 2. Polymyxins reference MIC ($\mu\text{g/mL}$) (reference method) x MPT test

		a. <i>Enterobacteriales</i> BMD MIC ($\mu\text{g/mL}$)						Non-fermentative BMD MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
		≤ 1	2	4	>4			≤ 1	2	4	>4
MPT MIC ($\mu\text{g/mL}$)	≤ 1	18				MPT MIC ($\mu\text{g/mL}$)	≤ 1	5	1	2	
	2		2	5			2	1			
	4		4	3	1		4	1			
	>4	1		1	33		>4	1		1	5

MIC identical with MIC by standard method highlighted in grey.
Blue numbers showed the results that presented Major Errors (ME).
Red numbers showed the results that presented Very Major Errors (VME).

Table 3. Polymyxins reference MIC (reference method) x CSTT test

		a. <i>Enterobacteriales</i> BMD MIC				b. Non-fermentative BMD MIC	
		<i>Susceptible</i>	<i>Resistant</i>			<i>Susceptible</i>	<i>Resistant</i>
CSTT MIC	<i>Susceptible</i>	22	3	CSTT MIC	<i>Susceptible</i>	9	3
	<i>Resistant</i>	3	40		<i>Resistant</i>	0	5

Isolates with CA compared with MIC by reference method are highlighted in grey.
Blue numbers showed the results that presented Major Errors (ME).
Red numbers showed the results that presented Very Major Errors (VME).

Table 4. Performance of the elution methods (CBM, MPT and CSTT) in comparison to the reference method (BMD) for *Enterobacteriales* and non-fermentative isolates.

Isolates	BMD		CBM			MPT			CSTT		
	R	S	CA and EA	ME and VME	Sensitivity and Specificity	CA and EA	ME and VME	Sensitivity and Specificity	CA	ME and VME	Sensitivity and Specificity
Non fermentative	8	9	76.47 and 82.35 %	33.33 and 12.5 %	87.5 and 66.67%	76.47 %	22.22 and 25%	75 and 77.78%	82.35 %	0 and 37.5%	62.5 and 100%
<i>Enterobacteriales</i>	43	25	91.18 and 95.59 %	16 and 4.65%	95.35 and 84%	85.29 and 98.53%	20 and 11.63%	88.37 and 80%	91.18 %	12 and 6.98%	93.02 and 88%

RESULTADOS ADICIONAIS RELACIONADOS AO PROJETO DA TESE

Nosso grupo avaliou 4778 isolados quanto à presença do gene *mcr-1*, sendo encontrados 5 isolados clínicos produtores desse gene: *E. coli* 3431F, 5798F e 6699F e *K. pneumoniae* 5798 F e 6701F. Todos os isolados eram coprodutores da carbapenemase KPC-2. O perfil de suscetibilidade dos 5 isolados encontra-se no Artigo IV. Os isolados 3431F, 3111F e 5798F foram analisados através de sequenciamento do genoma total e através de experimentos de conjugação e transformação. Os dados do isolado 3431F encontram-se no Artigo I e do isolado 3111F encontram-se no Artigo II.

Os dados do isolado 5798F não foram submetidos à publicação e seguem abaixo: os resultados da conjugação demonstraram que o plasmídeo contendo o gene *mcr-1*, bem como o plasmídeo contendo o gene *bla*_{KPC-2} foram transferidos concomitantemente por conjugação para a cepa receptora *E. coli* J53. PCR para identificação dos genes *mcr-1* e *bla*_{KPC-2} foi positiva nos plasmídeos dos transconjugantes confirmando a efetividade do experimento de conjugação. A microdiluição em caldo de diversos antibióticos frente à cepa selvagem (5798F), o transconjugante (5798C) e a cepa doadora (J53) foi realizada. O transconjugante apresentou aumento considerável da CIM da colistina e dos carbapenêmicos comparada com a cepa receptora (*E. coli* J53) (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado da CIM da cepa receptora (J53), transconjugante (5798C) e da cepa selvagem (5798F) frente a diversos antibióticos.

Antibiótico	<i>E. coli</i> 5798F (µg/mL)	Transconjugante 5798C (<i>mcr-1</i> e <i>bla</i> _{KPC-2}) (µg/mL)	<i>E. coli</i> J53 (µg/mL)
Ertapenem	16	1	≤0,5
Imipenem	16	4	≤0,5
Meropenem	8	2	≤0,5
Ciprofloxacino	≥64	≤0,125	≤0,125
Amicacina	8	≤1	≤1
Gentamicina	2	≤0,125	≤0,125
Tigeciclina	1	0,13	0,13
Colistina	4	4	≤0,125

A partir dos dados obtidos no sequenciamento do genoma total, pode-se inferir que o isolado 5798F pertence à ST437, a qual também foi relatada nos Estados Unidos em isolado de origem humana carregando os genes *mcr-1* e *bla_{CTX-M}* (McGANN et al., 2016). Através da ferramenta ResFinder foi confirmada a presença do gene *mcr-1*, bem como a presença do gene *aadA12*, *bla_{KPC-2}*, *sul1* e *sul2*, *tet(A)* e *tet(B)* e *dfrA1*. Através da ferramenta PlasmidFinder e do Programa Geneious podemos inferir que o grupo de incompatibilidade plasmidial deste isolado é o mesmo dos outros isolados encontrados em nosso grupo: IncX4.

5 DISCUSSÃO GERAL

O primeiro relato do mecanismo de resistência plasmidial frente às polimixinas ocorreu em novembro de 2015, por Liu e colaboradores, na China. O gene responsável por esse mecanismo foi denominado *mcr-1* e causou grande preocupação mundial, visto que a disseminação desse gene de resistência poderia estar associada à resistência a uma das últimas classes de antimicrobianos utilizados para tratamento de infecções graves causadas por BGN resistentes aos carbapenêmicos (LIU et al., 2016). Em 2016, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou um comunicado de risco orientando para a identificação, notificação e prevenção do gene *mcr-1* no Brasil, bem como destacou o papel dos laboratórios e das comissões e coordenações de controle de infecção no controle de infecções, vigilância e monitoramento (ANVISA, 2016).

Diante disso, nosso grupo de pesquisa iniciou um estudo para detecção do gene *mcr-1* em enterobactérias com sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos provenientes de um estudo de vigilância prévio (amostragem retrospectiva) e atual (amostragem prospectiva) que englobava diversas instituições de saúde do Estado do Rio Grande do Sul durante os anos de 2013 a 2018. Durante os três anos de pesquisa, nosso laboratório - LABRESIS (Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana) localizado no Centro de Pesquisa Experimental, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre avaliou 4778 isolados quanto à presença do gene *mcr-1*, sendo encontrados 5 isolados clínicos produtores desse gene.

Como mencionado inicialmente, o gene *mcr-1* foi descrito pela primeira vez em 2015 e atualmente há descrições desse gene tanto em amostras animais, humanas e ambientais, em todo o mundo, inclusive em vários estados do Brasil (AIRES et al., 2017; CONCEIÇÃO-NETO et al., 2017; DALMOLIN et al., 2017; PILLONETTO et al., 2018; ROCHA et al., 2017; ROSSI et al., 2017).

A prevalência do gene *mcr-1* em bactérias produtoras de carbapenemases encontrada no nosso estudo foi de 0,1%. Quando comparada com a prevalência de outros estudos pode-se demonstrar que a mesma é normalmente baixa, porém é bem diversificada de país para país. Estudo realizado em Portugal em isolados de

enterobactérias produtoras de carbapenemase a prevalência foi de 6,69% (MENDES et al., 2018). Estudo realizado na Bélgica apresentou prevalência mais próxima à encontrada em nosso estudo, a qual foi de <1% em enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC) (PRINCIPE et al., 2018).

Dentre os isolados produtores do gene *mcr-1*, três isolados eram *E. coli* (3431F, 5798F e 6699F) e dois isolados eram *K. pneumoniae* (3111F e 6701F). Todos isolados foram oriundos de swabs retais, exceto um isolado de *E. coli* que foi oriundo de fluido de ascite, demonstrando que esse gene pode estar relacionado a casos de infecção e não somente de colonização. Todos os isolados eram coprodutores da carbapenemase KPC-2. Esse fato da coprodução é bastante preocupante devido principalmente à escassez de opções de tratamento, visto que micro-organismos produtores de KPC são resistentes a todos beta-lactâmicos e a outras classes de antimicrobianos o que limita muito as opções de tratamento (WANG et al., 2017).

Quanto ao perfil de suscetibilidade dos isolados produtores de MCR-1, 4 isolados apresentaram baixa resistência às polimixinas (4µg/mL) e um isolado de *K. pneumoniae* (6701F) apresentou-se sensível às polimixinas (0,25µg/mL). A presença do gene *mcr-1* em isolados que não apresentam resistência às polimixinas é preocupante, uma vez que, o gene é usualmente pesquisado em amostras resistentes às poliximinas, o que pode ser evidenciado também no comunicado de risco da ANVISA, que estabelece que laboratórios de microbiologia ao detectarem cepas de *E. coli* com CIM \geq 4mg/L, ou seja, apenas amostras resistentes, deve-se informar à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do serviço de saúde (ANVISA, 2016).

Isolados produtores de MCR-1, porém sensíveis às polimixinas, têm sido reportados em alguns estudos e dentre as explicações plausíveis para tal fato, pode-se citar que o gene *mcr-1* possa estar truncado, como descrito em isolado de *Shigella sonnei* (PHAM et al., 2016). Porém essa não seria a única razão, visto que há estudos de isolados de *E. coli* com o gene *mcr-1* intacto, porém ainda sensíveis à colistina (LIASSINE et al., 2016). Mais estudos envolvendo o isolado 6701F serão necessários para a exata explicação da sensibilidade deste isolado. A presença do gene *mcr-1* em isolados sensíveis às polimixinas podem contribuir para uma silenciosa disseminação do gene *mcr-1* através da transferência do plasmídeo contendo gene *mcr-1* para

bactérias multirresistentes, como por exemplos BGN resistentes aos carbapenêmicos (FERNANDES et al., 2016a).

Os isolados com o gene *mcr-1* apresentaram elevada resistência aos carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem), devido à presença concomitante da enzima KPC-2. Além disso, os isolados portadores do gene *mcr-1* foram resistentes à ciprofloxacina e sensíveis à tigeciclina. A suscetibilidade frente aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) foi variável, com predomínio de isolados sensíveis e/ou intermediários.

No presente estudo, 3 isolados clínicos coprodutores de MCR-1 e KPC-2 (3431F, 3111F e 5798F) foram analisados através de sequenciamento do genoma total e através de experimentos de conjugação e transformação. Com os dados obtidos através do sequenciamento pode-se concluir que os plasmídeos que carregam o gene *mcr-1*, nos 3 isolados analisados, são do grupo de incompatibilidade plasmidial IncX4. De acordo com dados obtidos na literatura, o gene *mcr-1* não é restrito a apenas a um grupo de incompatibilidade plasmidial, sendo que já foi relatado a associação do gene *mcr-1* com grupos de incompatibilidade plasmidial IncI2, InHI2, IncF, IncHI1, IncY e IncP (HASMAN et al., 2015; LIU et al., 2016; POIREL et al., 2017a). Todos os plasmídeos carregando o gene *mcr-1* descritos no Brasil pertencem ao grupo de incompatibilidade plasmidial IncX4 (AIRES et al., 2017; DALMOLIN et al., 2017; SELLERA et al., 2017), o que indica alta afinidade entre essa família plasmidial e o gene *mcr-1* no nosso país.

Os dois isolados sequenciados de *E. coli* pertencem à ST diferentes. *E. coli* 3431F pertence à ST744, a qual é uma linhagem normalmente associada com genes de resistência e já foi relatada essa ST em diversos estudos. Hasman e colaboradores identificaram essa ST em um isolado clínico na Dinamarca que carregava o gene *mcr-1* e genes de ESBL (HASMAN et al., 2015), bem como Tacao e colaboradores encontraram a ST744 em isolado de origem humana carregando o gene *mcr-1* em Portugal (TACAO et al., 2017). Haenni e colaboradores, bem como Lupo e colaboradores encontraram na França em isolados de origem animal a mesma ST744 (HAENNI et al., 2018; LUPO et al., 2018). Isto demonstra a disseminação global de isolados pertencentes a esta ST. O isolado *E. coli* 5798F pertence à ST457, a qual

também foi relatada nos Estados Unidos em isolado de origem humana carregando os genes *mcr-1* e *bla_{CTX-M}* (McGANN et al., 2016).

O isolado de *K. pneumoniae* foi identificado como pertencente à ST437 do complexo clonal CC258. Esta ST já foi relatada em muitos países como Espanha (SEARA et al., 2015) e Brasil (FEHLBERG et al., 2012; PEREIRA et al., 2013), carregando outros genes de resistência, demonstrando, assim sua disseminação mundial. No Brasil esta ST é considerada de alto risco pela elevada prevalência no país associada ao gene *bla_{KPC}* (PEREIRA et al., 2013; SEARA et al., 2015).

Os resultados da conjugação demonstraram que o plasmídeo contendo o gene *mcr-1* dos 3 isolados (*E. coli* 3431F, *K. pneumoniae* 3111F e *E. coli* 5798F) foi transferido por conjugação para a cepa receptora *E. coli* J53, confirmando que o gene encontrava-se em um plasmídeo. O plasmídeo contendo o gene *bla_{KPC-2}* foi obtido por conjugação apenas quando transferido concomitantemente com o plasmídeo do gene *mcr-1*. Quando apenas o plasmídeo com o gene *bla_{KPC-2}* foi transferido, não foi possível obter o transconjugante, sendo necessária a realização do experimento de transformação para obter o transformante. Este achado também foi observado em outro estudo (AIRES et al., 2017) e a hipótese para esse fato é devido ao sistema toxina/antitoxina HicBA codificado pelo plasmídeo IncX4 que destruiria células-filhas livres do plasmídeo IncX4. Assim, selecionaria apenas células bacterianas com o plasmídeo do gene *mcr-1* IncX4 ou com ambos os plasmídeos dos genes *mcr-1* e *bla_{KPC-2}* (DMOWSKI; JAGURA-BURDZY, 2013).

Para confirmação dos experimentos de conjugação e transformação, foi realizada PCR confirmando os genes *mcr-1* e *bla_{KPC-2}* presente nos plasmídeos dos transconjugantes e transformantes. Também foi realizada a CIM para diversos antibióticos através da microdiluição em caldo e todos os transconjugantes com o plasmídeo carregando o gene *mcr-1* obtiveram um aumento considerável da CIM das polimixinas comparada com a cepa receptora (*E. coli* J53). Porém, o transconjugante com *mcr-1* do isolado 3111F, obteve aumento da CIM dos antibióticos ceftazidima e cefepime comparado com a cepa receptora. Após investigações suspeitou-se que este transconjugante carregava um plasmídeo extra, o que foi confirmado por PCR e pela

informação *in silico* do genoma total, sendo positivo para *bla*_{CTX-M}, o qual confere resistência às cefalosporinas.

No presente estudo, também foram avaliadas metodologias para detecção da resistência às polimixinas. O teste de referência para determinação da suscetibilidade às polimixinas é o teste de microdiluição em caldo, porém é considerado um método bastante laborioso e que é demorado para a liberação do resultado (em torno de 24 horas após isolamento bacteriano), bem com requer materiais que não são comumente encontrados na rotina laboratorial (POIREL et al., 2017a). As metodologias de disco difusão e gradiente em ágar, largamente utilizadas na rotina laboratorial, não são confiáveis para essa finalidade, visto que a difusão das polimixinas em ágar é lenta e irregular (LO-TEM-FOE et al., 2007). Diante disso, metodologias que facilitam a detecção da resistência na rotina laboratorial foram testadas. Foram avaliados isolados Gram-negativos frente às metodologias Teste Rápido NP Polimixinas (200 isolados), Policimbac® (112 isolados) e Ágar Superpolimixinas® (112 isolados). Também foram avaliados 85 isolados frente as modificações do teste de Eluição de Discos de Colistina (CBDE) com a finalidade de diminuir o custo do teste.

O Teste Rápido NP Polimixinas mostrou-se de fácil e rápida realização com resultados positivos em torno de 2 horas, além disso, esse teste apresentou excelente sensibilidade e especificidade, tanto para polimixina B quanto para colistina, quando comparado ao teste de referência. Estudos que avaliaram este teste também encontraram elevada sensibilidade e especificidade do mesmo (BAKTHAVATCHALAM et al., 2017; JAYOL et al., 2016; NORDMANN et al., 2016; YAINOY et al., 2018). Malli e colaboradores (2018) encontraram uma excelente sensibilidade para o teste, porém uma menor especificidade foi encontrada comparada aos outros estudos supracitados, indicando que seria considerada uma boa metodologia para utilização na detecção de isolados resistente às polimixinas (MALLI et al., 2018).

Poirel e colaboradores (2018) relataram que a sensibilidade do teste na detecção de isolados resistentes às polimixinas carreando os genes *mcr-1* e *mcr-2* foi de 100%. Em nosso estudo, os resultados dos isolados resistentes às polimixinas carreando o gene *mcr-1* foram concordantes com a microdiluição em caldo. Porém, dois isolados sensíveis às polimixinas e carreando o gene *mcr-1* apresentaram resultados falso-

positivos. O Teste Rápido NP Polimixinas apresentou resultados bastante satisfatórios e poderia contribuir para uma rápida detecção da resistência às polimixinas e, portanto, uma implantação rápida de medidas de prevenção a fim de evitar um surto em isolados multirresistentes (POIREL et al., 2018).

Os testes Policimbac® e Ágar Superpolimixinas® são considerados metodologias menos laboriosas que o teste de referência, porém em nosso estudo ambos os testes apresentaram baixa especificidade, sendo necessária a confirmação dos resultados resistentes. Na literatura não há estudos avaliando o teste Policimbac® para compararmos com nossos resultados. A baixa especificidade deste teste pode estar relacionada com o tempo de permanência das polimixinas em contato com a placa de poliestireno, e, portanto a ligação das mesmas na placa.

Portanto, este fato poderia ocasionar a diminuição da concentração do antibiótico, gerando resultados falso-resistentes. Outra explicação plausível para a baixa especificidade poderia ser a falta de homogeneização após adição da suspensão bacteriana, podendo ocasionar a errônea ressuspensão ocasionando também, uma menor concentração de antibiótico no poço.

O Ágar Superpolimixinas® foi avaliado em outros estudos (ABDUL MOMIM et al., 2017; BARDET et al., 2017; JAYOL et al., 2018; NORDMANN et al. 2016b) apresentando resultados mais satisfatórios dos que os resultados encontrados em nosso estudo. As concentrações bacterianas utilizadas por outros pesquisadores foram diferentes da utilizada em nosso estudo, portanto essa metodologia é considerada dependente da concentração do inóculo microbiano. O protocolo do fabricante não especificava a concentração do inóculo microbiano que deveria ser utilizada, portanto avaliamos uma concentração que facilitaria a utilização na rotina laboratorial (10µL da escala 0,5 de McFarland – 1×10^6 UFC/spot), e repetimos os resultados discrepantes com concentrações do inóculo menores (1×10^3 UFC/spot).

Simner e colaboradores (2018) propuseram um teste com abordagem bastante prática para avaliação do perfil de suscetibilidade de bactérias Gram-negativas frente à colistina: o teste de eluição do disco de colistina. A partir desta nova metodologia, nosso grupo avaliou algumas modificações com a finalidade de reduzir o volume necessário (de 10 mL do teste original para 1mL – Microeluição da Colistina - CBM e

200µL – Microeluição em Placa de Polimixinas - MPT) em cada ensaio, e, portanto o valor final do teste. Também avaliamos o Tubo teste de Suscetibilidade da Colistina (CSTT). Quando comparado com o teste referência (BMD), nossos resultados para bactérias da ordem *Enterobacterales* mostraram que as modificações do teste CBDE apresentaram bons valores de sensibilidade e especificidades, porém o valor de Erros Muito Importantes (*Very Major Errors – VME*) e Erros Importantes (*Very Errors – ME*) foram menos satisfatórios. Para isolados não fermentadores, nenhuma das modificações foi considerada aceitável, porém cabe mencionar que o número de isolados foi pequeno para estabelecer uma conclusão final.

Por fim, nossos resultados contribuem para a compreensão da epidemiologia local do gene *mcr-1*, apontando as principais características encontradas nos isolados que carregavam esse gene. Apesar de atualmente a presença do gene *mcr-1* não ser o principal mecanismo de resistência às polimixinas, a descrição da coocorrência do gene *mcr-1* e *bla_{KPC-2}*, o qual é endêmico no Brasil, ressalta a importância da pesquisa desse gene em função da sua potencial transferência para isolados multirresistentes. Além disso, o estudo avaliou metodologias que poderiam ser utilizadas na rotina laboratorial para então facilitar o trabalho, bem como a liberação de resultados confiáveis.

6 CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os objetivos deste estudo, podemos observar como conclusões gerais:

- A descrição de cinco isolados clínicos (*K. pneumoniae* 3111F, *E. coli* 3431F, *E. coli* 5798F, *K. pneumoniae* 6701F e *E. coli* 6699F) coprodutores dos genes *mcr-1* e *bla_{KPC}-2*.
- Os isolados produtores do gene *mcr-1* foram analisados quanto ao seu perfil de suscetibilidade, apresentando baixa resistência à colistina (4µg/mL), exceto o isolado *K. pneumoniae* 6701F que foi sensível à colistina (0,25µg/mL) e elevada resistência aos carbapenêmicos.
- O plasmídeo contendo o gene *mcr-1* em todos isolados avaliados (3111F, 3431F e 5798F) pode ser transferido através de conjugação.
- Os plasmídeos que carregam os genes *mcr-1* oriundos dos isolados 3111F, 3431F e 5798F encontram-se no mesmo grupo de incompatibilidade plasmidial (IncX4) e fazem parte da ST437, ST744 e ST457, respectivamente.
- O teste fenotípico Rápido NP Polimixinas mostrou desempenho excelente para detecção da suscetibilidade tanto da polimixina B como da colistina, quando comparados ao método de referência. Também pode-se observar uma expressiva redução no tempo para obtenção do resultado.
- Tanto o teste Policimbac® quanto o Ágar Superpolimixinas® são úteis para detecção de isolados resistentes às polimixinas. Tratando-se de isolados sensíveis, ambos os testes não apresentaram alta especificidade e VPP, sendo necessária a confirmação dos resultados desses isolados ou refinamento das técnicas, a fim de obter melhores resultados.
- Dentre as modificações realizadas na metodologia de eluição da colistina (CBDE), todas apresentaram valor acima dos aceitáveis de Erros Muito Importantes (*Very Major Errors – VME*) e Erros Importantes (*Major Errors -ME*) em comparação com o teste referência. Estes testes poderiam ser utilizados como testes *screening*, principalmente o teste CSTT, uma vez que são fáceis, baratos e utilizam materiais comumente encontrados em laboratórios. Para isolados não fermentadores, nenhuma

das modificações foi considerada aceitável, porém cabe mencionar que o número de isolados foi restrito para análise.

REFERÊNCIAS

- ABDUL MOMIN, M. H. F. et al. CHROMagar COL-APSE: a selective bacterial culture medium for the isolation and differentiation of colistin-resistant Gram-negative pathogens. **J Med Microbiol**, v. 66, p. 1554-1561, 2017.
- ABUOUN, M. et al. *mcr-1* and *mcr-2* variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n. 10, p. 2745-2749, 2017.
- ADLER, A.; KATZ, D. E.; MARCHAIM, D. The continuing plague of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* infections. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, p. 347-375, 2016.
- AIRES, C. A. M. et al. Emergence of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 7, pii: e00317-17, 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Comunicado de risco nº 01/2016 – GVIMS/GGTES/ANVISA. Brasília, 2016.
- ALBA, P. et al. Molecular epidemiology of *mcr*-encoded colistin resistance in *Enterobacteriaceae* from foodproducing animals in Italy revealed through the eu harmonized antimicrobial resistance monitoring. **Front Microbiol**, v. 9, p. 1217, 2018.
- BAKTHAVATCHALAM, Y. D. et al. Polymyxin Nordmann/Poirel test for rapid detection of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*: Indian experience. **Indian J Med Microbiol**, v. 34, p. 564-565, 2016.
- BARDET, L. et al. LBJMR medium: a new polyvalent culture medium for isolating and selecting vancomycin and colistin-resistant bacteria. **BMC Microbiol**, v. 17, p. 1-10, 2017.
- BARON, S. et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **Int J AntimicrobiAgents**, v. 48, n. 6, p. 583-591, 2016.
- BENEDICT, R. G.; LANGLYKKE, A. F. Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*. **J Bacteriol**, v. 54, p. 24, 1947.
- BOROWIAK, M. et al. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, p. 3317-3324, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 505, de 22 de novembro de 2016. Proíbe, em todo o território nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, nº 229, seção 1, p. 6, 2016.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Versão 8.0. 2018.

BROWN, L. et al. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 10, p. 620–630, 2015.

BULMAN, Z. P. Polymyxin combinations combat *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *bla_{NDM-5}*: preparation for a postantibiotic era. **MBio**, v. 8, n. 4, p. e00540-17, 2017.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.

CAMPOS, J. et al. MCR-1 in multidrug-resistant and copper-tolerant clinically relevant *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- and *S. Rissen* clones in Portugal, 2011 to 2015. **Euro Surveill**, v. 21, n. 26, p. 30270, 2016.

CARATOLLI, A. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Euro Surveill**, v. 22, n. 31, pii: 30589, 2017.

CONCEIÇÃO-NETO, O. C. et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v. 50, n. 2, p. 282-284, 2017.

DALMOLIN, T. V. et al. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 90, n. 2, p.132-133, 2018a.

DALMOLIN, T. V. et al. Co-occurrence of *mcr-1* and *bla_{KPC-2}* in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n. 8, p. 2404-2406, 2017.

DALMOLIN, T. V. et al. Low prevalence of the *mcr-1* gene among carbapenemase-producing clinical isolates of *Enterobacterales*. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 2018b. In press.

DELGADO-BLAS, J. F. et al. Coexistence of *mcr-1* and *bla_{NDM-1}* in *Escherichia coli* from Venezuela. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 10, p.6356-6358, 2016.

DI PILATO, V. et al. *mcr-1.2*, a new *mcr* variant carried on a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 512. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, p. 5612-5615, 2016.

DMOWSKI, M., JAGURA-BURDZY, G. Active stable maintenance functions in low copy-number plasmids of Gram-positive bacteria. **Pol J Microbiol**, v. 62, p. 3–16, 2013.

DU, H. et al. Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Lancet Infect Dis**, v. 15, n. 3, p. 287–288, 2016.

ELLEM, J. A. et al. Locally acquired *mcr-1* in *Escherichia coli*, Australia, 2011 and 2013. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 7, p.1160-1163, 2017.

FALGENHAUER, L. et al. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended spectrum β -lactamase producing and carbapenemase producing Gram-negative bacteria in Germany. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 3, p. 280, 2016.

FEHLBERG, L. C. C. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v.16, p. 577-580, 2012.

FERNANDES, M. R. et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. **Euro Surveill**, v. 21, n. 17, p. 30214, 2016a.

FERNANDES, M. R. et al. Authors' reply: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. **Euro Surveill**, v. 21, n. 26, p. 30268, 2016b.

FERNANDES, M. R. et al. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* ST101 isolated from a human infection in Brazil. **Antimicrob Agents Chemoter**, v. 60, n. 10, p; 6415-7, 2016c.

FERNANDES, M. R. et al. Colistin-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli* on public beaches, an infectious threat emerging in recreational waters. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 7, pii: e00234-17, 2017.

GARG, S. K. et al. Resurgence of Polymyxin B for MDR/XDR Gram-negative infections: an overview of current evidence. **Crit Care Res Pract**, p. 1-10, 2017.

HAENNI, M. et al. Epidemic spread of *Escherichia coli* ST744 isolates carrying *mcr-3* and *bla*_{CTX-M-55} in cattle in France. **J Antimicrob Chemother**, v. 73, n. 2, p. 533-536, 2018.

HAIDER, M. et al. Necessity of detection of extended spectrum β -lactamase, AmpC and metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria isolated from clinical specimens. **Muller J Med Sci Res**, v. 5, n. 1, p. 23-28, 2014.

HASMAN, H. et al. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark. **Euro Surveill**, v. 20, n. 49, p. 30085, 2015.

IRRGANG, A. et al. Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from livestock and food in Germany, 2010–2015. **PlosOne**, v. 11, n. 7, p. e0159863, 2016.

JAYOL, A. et al. Detection of colistin-resistant Gram-negative rods by using the SuperPolymyxin medium. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 92, n. 2, p. 95-101, 2018.

JAYOL, A. et al. Rapid detection of polymyxin-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures. **J Clin Microbiol**, v. 54, n. 9, p. 2273-2277, 2016.

KIEFFER, N.; NORDMANN, P.; POIREL, L. *Moraxella* species as potential sources of MCR-like polymyxin resistance determinants. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 6, pii: e00129-17, 2017.

LENTZ, S. A. et al. Letter to the editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. **Euro Surveill**, v. 21, n. 26, p. 30267, 2016.

LIASSINE, N. et al. Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract *Enterobacteriaceae* in Switzerland. **Int J Infect Dis**, v. 51, p. 4-5, 2016.

LI, Y. et al. Rapid increase in prevalence of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) and emergence of colistin resistance gene *mcr-1* in CRE in a hospital in Henan, China. **J Clin Microbiol**, v. 56, n. 4, p. e01932-17, 2018.

LIU, H. et al. A novel *mcr-1* variant carried by an IncI2-Type plasmid identified from a multidrug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Front Microbiol**, v. 9, p. 815, 2018.

LIU, L. et al. New variant of *mcr-3* in an extensively drug-resistant *Escherichia coli* clinical isolate carrying *mcr-1* and *bla_{NDM-5}*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 12, pii: e01757-17, 2017.

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**, v. 16, p.161–68. 2016.

LOOKE, D. F. M. et al. Gram-negative resistance: can we combat the coming of a new “Red Plague”? **Med J Aust**, v. 198, n. 5, p. 243-244, 2013.

LORENZONI, V. V. et al. Bloodstream infection by *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* in a cancer patient in southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 22, n. 4, p. 356-357, 2018.

LO-TEM-FOE, J. R. et al. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 10, p. 3726-30, 2007.

LU, X. et al. *mcr-1.6*: a new *mcr* variant carried by an IncP plasmid in a colistin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from a healthy individual. **Antimicrob Agents Chemother**. 2017. In press.

LUPO, A. et al. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 77, p. 179–194, 2013.

LUPO, A. et al. Emergence of *bla*_{CTX-M55} associated with *fossa*, *rmtB* and *mcr* gene variants in *Escherichia coli* from various animal species in France. **J Antimicrob Chemother**, v. 73, n. 4, p. 867-872, 2018.

MALLI, E. et al. Evaluation of rapid polymyxin NP test to detect colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated in a tertiary Greek hospital. **J Microbiol Methods**, v. 153, p. 35-39, 2018.

McGANN, P. et al. *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *bla*_{CTX-M} on a novel IncF plasmid: first report of *mcr-1* in the United States. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 7, p. 4420-1, 2016.

MENDES, A. C. et al. *mcr-1* in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients, Portugal, 2016–2017. **Emerg Infect Dis**, v. 24, p. 762-766, 2018.

MOELLERING, R. C. J. NDM-1- a cause for worldwide concern. **N England J Med**, v. 363, p. 2377-2379, 2010.

MOLINA, J. et al. New information about the polymyxin/colistin class of antibiotics. **Expert Opin Pharmacother**, v. 10, n. 17, p. 2811–2828, 2009.

MONTE, D. F. et al. Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying *mcr-1* genes in South America. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 5, pii: e02718-16, 2017.

MORENO, L. Z. et al. First report of *mcr-1*-harboring *Salmonella enterica* serovar *Schwarzengrund* isolated from poultry meat in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 2018. In press.

MULVEY, M. R. et al. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 3, p. 289-90, 2016.

NORDMANN P., CUZON G., NAAS T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infect Dis**, v. 9, p. 228-236, 2009.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 10, p. 1791-1798, 2011.

NORDMANN, P.; POIREL, L.; DORTET, L. Rapid detection of carbapenem-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 9, p. 1503-1507, 2012a.

NORDMANN, P. et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 5, p. 432- 438, 2012b.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 9, p. 821-830, 2014.

NORDMANN, P.; JAYOL, A.; POIREL, L. A universal culture medium for screening polymyxin-resistant Gram-negative isolates. **J Clin Microbiol**, v. 54, n. 5, p. 1395-9, 2016b.

NORDMANN, P.; JAYOL, A.; POIREL, L. Rapid detection of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 6, p. 1038-1043, 2016a.

OLIVEIRA, F. A. et al. MCR-1-positive colistin-resistant *Escherichia coli* in immunocompromised hospitalised patients. **Int J Antimicrob Agents**, v. 52, n. 3, p. 438-440, 2018.

PALMEIRA, J. D. et al. Draft genome of a ST443 *mcr-1*- and *bla*_{CTX-M-2}-carrying *Escherichia coli* from cattle in Brazil. **J Glob Antimicrob Res**, v. 13, p. 269–270, 2018.

PHAM THANH, D. et al. Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne *mcr-1* gene in a 2008 Vietnamese *Shigella sonnei* isolate. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, p. 2314-2317, 2016.

PEREIRA, P. S. et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **J Antimicrob Chemother**, v. 68, p. 312-6, 2013.

PETRILLO, M. et al. Possible genetic events producing colistin resistance gene *mcr-1*. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 3, p. 280, 2016.

PILLONETTO, M. et al. Low level of polymyxin resistance among nonclonal *mcr-1*-positive *Escherichia coli* from human sources in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 2018. In press.

POIREL, L. et al. Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 3, p. 281, 2016.

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

POIREL, L., KIEFFER, N.; NORDMANN, P. *In vitro* study of IS*AplI*-mediated mobilization of the colistin resistance gene *mcr-1*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 7, pii: e00127-17, 2017b.

POIREL, L. et al. Rapid Polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance mediated by the *mcr-1/mcr-2* genes. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 90, n. 1, p. 7-10, 2018.

PRIM, N et al. Detection of *mcr-1* colistin resistance gene in polyclonal *Escherichia coli* isolates in Barcelona, Spain, 2012 to 2015. **Euro Surveill**, v. 21, n.3, p. 30183, 2016.

PRINCIPE, L. et al. Multicenter prospective study on the prevalence of colistin resistance in *Escherichia coli*: relevance of *mcr-1*-positive clinical isolates in Lombardy, Northern Italy. **Infect Drug Resist**, v. 11, p. 377–385, 2018.

PROBAC. Policimbac®. Disponível em: <<http://www.probac.com.br/Anexos/Bulas/Meios%20Susceptibilidade/Policimbac%20-%20Rev%2000.pdf>>. Acesso em: 20 de outubro de 2018.

QUEENAN, A. M; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 30, p 440-458, 2007.

RAPOPORT, M. et al. *mcr-1*-mediated colistin resistance in human infections caused by *Escherichia coli*: First description in Latin America. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 7, p. 4412-2, 2016.

RAU, R. B. et al. Emergence of *mcr-1* producing *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* from retail meat: first detection in Brazil. **Foodborne Pathog Dis**, v. 15, n. 1, p. 58–59, 2018.

RIBEIRO, V. B. et al. Detection of *bla*_{KPC-2} in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, p. 2776-2777, 2012.

ROCHA, I. V. et al. Ciprofloxacin-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST410 strain carrying the *mcr-1* gene associated with bloodstream infection. **Int J Antimicrob Agents**, v. 49, n. 5, p. 655-656, 2017.

ROSSI, F. et al. Plasmid-mediated *mcr-1* in carbapenem-susceptible *Escherichia coli* ST156 causing a blood infection: an unnoticeable spread of colistin resistance in Brazil? **Clinics**, v. 72, n. 10, p. 642–644, 2017.

SACRAMENTO, A. G. et al. Genomic analysis of MCR-1 and CTX-M-8 co-producing *Escherichia coli* ST58 isolated from a polluted mangrove ecosystem in Brazil. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 15, p. 288-289, 2018.

SADER, H. S. et al. Differences in potency and categorical agreement between colistin and polymyxin B when testing 15,377 clinical strains collected worldwide. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 83, n. 4, p. 379-81, 2015.

SEARA, N. et al. Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. **Int. J Antimicrob Agents**, v. 46, p. 169–173, 2015.

SELLERA, F. P. et al. *Escherichia coli* carrying IncX4 plasmid-mediated *mcr-1* and *bla*_{CTX-M} genes in infected migratory Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **J Antimicrob Chemother**, v. 72, p. 1255–1256, 2017.

SHERRY, N.; HOWDEN B. Emerging Gram negative resistance to last-line antimicrobial agents fosfomicin, colistin and ceftazidime-avibactam - epidemiology, laboratory detection and treatment implications. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.16, n. 4: p. 289-306, 2018.

SIMNER, P. J. et al. Two-site evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test to determine colistin *in vitro* activity against Gram-negative bacilli. **J Clin Microbiol**, 2018. In Press.

SKOV, R. L. et al. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. **Euro Surveill**, v. 21, n. 9, p. 30155, 2016.

SNESRUD, E. et al. A model for transposition of the colistin resistance gene *mcr-1* by IS*ApI1*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 11, p. 6973-6976, 2016.

SNESRUD, E. et al. Analysis of serial isolates of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* reveals a highly active IS*ApI1* transposon. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 5, pii: e00056-17, 2017.

SRINIVAS, P.; RIVARD, K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. **Curr Infect Dis Rep**, v. 19, p. 38, 2017.

TACÃO, M. et al. *mcr-1* and *bla_{KPC-3}* in *Escherichia coli* Sequence Type 744 after meropenem and colistin therapy, Portugal. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 8, p. 1419–1421, 2017.

THEURETZBACHER, U. Global antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens and clinical need. **Curr Opin Microbiol**, v. 39, p. 106-112, 2017.

TIJET, N. et al. Molecular characteristics of *mcr-1*-carrying plasmids and new *mcr-1* variant recovered from polyclonal clinical *Escherichia coli* from Argentina and Canada. **PlosOne**, v. 12., n. 7, p. e0180347, 2017.

TONG, S. Y., GIFFARD, P. M. Microbiological applications of high-resolution melting analysis. **J Clin Microbiol**, v. 50, p. 3418-21, 2012.

TONINI, M. A. et al. Carbapenem-susceptible *Escherichia coli* ST3901 carrying *mcr-1* and *bla_{CTX-M}* genes isolated from a diabetic foot infection in Brazil. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 13, p. 209-210, 2018.

TSAI, Y. et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 4, p. 1485–1493, 2011.

TSE, H.; YUEN, K. Y. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 145-6, 2016.

WALSH, T. R., Wu, Y. China bans colistin as a feed additive for animals. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 10, p. 1102-1103, 2016.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. Class A carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, n. 3, p. 470-82, 2007.

WANG, Y. et al. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1* positive *Enterobacteriaceae* in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. **Lancet Infect Dis**, v.17, p. 390–9, 2017.

WANG, R. et al. The prevalence of colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from food animals in China: coexistence of *mcr-1* and *bla_{NDM}* with low fitness cost. **Int J Antimicrob Agents**, v. 51, n. 5, p. 739-744, 2018.

WANG, X. et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerg Microbes Infect**, v. 7, n. 1, p.122, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Antimicrobial Resistance. Global report on surveillance. Geneva, Switzerland: WHO, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva, Switzerland: WHO, 2017. 257 p.

XAVIER, B. B. et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 27, p.30280, 2016.

YAINOY, S. et al. Evaluation of the Rapid Polymyxin NP test for detection of colistin susceptibility in *Enterobacteriaceae* isolated from Thai patients. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 92, n. 2, p. 102-106, 2018.

YANG, Y. Q. et al. Colistin resistance gene *mcr-1* and its variant in *Escherichia coli* isolates from chickens in China. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 5, pii. e01204-16, 2017.

YANG, Y. Q. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother**, v. 73, p. 1791-1795, 2018.

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.

YIN, W. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. **MBio.**, v. 8, n. 3, pii. e00543-17, 2017.

ZAVASCKI, A. P. et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, n. 6, p. 1206–1215, 2007.

ZHAO, D. et al. Coexistence of *mcr-1*, *bla_{KPC-2}* and two copies of *fosA3* in a clinical *Escherichia coli* strain isolated from urine. **Infect Genet Evol**, v. 60, p.77-79, 2018.

ZURFLUH, K. et al. Key features of *mcr-1* bearing plasmids from *Escherichia coli* isolated from humans and food. **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 6, p. 91, 2017.

ANEXOS

Anexo – 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Resistência às polimixinas associadas ao gene mcr: contexto genético de isolados de Escherichia coli de origem animal portadores do gene e avaliação de isolados de origem humana

Pesquisador: Afonso Luis Barth

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 59567616.6.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.790.827

Apresentação do Projeto:

O mecanismo de resistência ligado às polimixinas em membros da família Enterobacteriaceae era mediado por mutações cromossômicas, porém recentemente foi reportado, a presença de um gene de resistência à colistina mediado por plasmídeos, mcr-1. Este relato mudou o cenário de resistência ligada às polimixinas e a possibilidade de uma transferência horizontal desse gene, sendo encontrado em diversos lugares do mundo e em espécies da família Enterobacteriaceae, na maioria das vezes em Escherichia coli. O gene mcr-1 não é restrito apenas a um grupo plasmidial, sendo encontrado, no grupo de plasmídeos IncI2, IncX4 e IncHI2. A presença do gene mcr-1 tem sido bastante associado com -lactamases de espectro estendido (EBSL), genes de resistência para quinolonas (qnrS e aac(6=)-Ib-cr) e carbapenemases (blaKPC e blaNDM). Em 2016, também foi relatado a existência do gene mcr-2 em amostras de E. coli resistentes à colistina e que não apresentavam o gene mcr-1. Dada a constante troca de genes de resistência em todos os microbiomas (animais, meio ambiente e população humana), a pesquisa para avaliar a real dimensão da resistência mediada pelo gene mcr deve ser encorajada, portanto o objetivo deste estudo é realizar uma análise molecular de isolados de E.coli de origem animal portadores do gene mcr e sua possível disseminação para isolados de origem humana.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 1.790.827

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Análise molecular de isolados de E.coli de origem animal portadores do gene mcr e sua possível disseminação para isolados de origem humana.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar por sequenciamento de nova geração o genoma completo das amostras de E. coli portadoras do gene mcr-1;
2. Avaliar a coprodução dos genes blaCTX-M, blaSHV, blaTEM, blaIBC, qnrA, qnrB, qnrS e das principais carbapenemases (VIM, KPC, NDM-1, IMP, GES e OXA-48) em isolados de E. coli positivas para mcr-1;
3. Analisar a presença do gene mcr-2 em isolados de E. coli de aves de produção positivas e negativas para mcr-1;
4. Realizar MLST e estabelecer relação entre as STs de E.coli com o gene de mcr-1 obtidas das aves com as já descritas na literatura;
5. Avaliar a presença do gene mcr-1 e mcr-2, retrospectiva e prospectivamente a partir de amostras clínicas;
6. Realizar MLST das amostras clínicas positivas para o gene mcr;
7. Avaliar o desempenho do teste fenotípico rápido de detecção de resistência as polimixinas em amostras mcr positivas e negativas;
8. Comparar o ambiente genético do gene mcr oriundo de animais e humanos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O trabalho será desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) locado no Centro de Pesquisa Experimental – CPE, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Serão utilizados procedimentos padronizados de biossegurança em todas as etapas experimentais, incluindo o uso de luvas e avental. Materiais contaminados e/ou potencialmente tóxicos serão descartados conforme as regras de biossegurança recomendadas para cada caso, garantindo a segurança dos pesquisadores envolvidos e do meio-ambiente. O material perfuro-cortante contaminado com materiais biológicos será acondicionado em caixas de papelão apropriadas até seu recolhimento e destinação final.

Risco de quebra de confidencialidade.

Benefícios:

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 1.790.827

1. Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento da epidemiologia do gene mcr.
 2. Melhor entendimento do contexto genético de isolados com mcr.
- Sem benefícios diretos aos participantes, potencial benefício coletivo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem escrito, com alta relevância científica e metodologia adequada as questões de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Solicitada dispensa de TCLE e apresentado Termo de Compromisso para Utilização de Amostras Biológicas e Informações Associadas. O projeto pretende usar amostras de outro projeto previamente consentido.

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 1.759.292 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 05/10/2016. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão projeto de 05/10/2016 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto. Para que possa ser realizado o mesmo deve estar cadastrado no sistema WebGPPG em razão das questões logísticas e financeiras.

O projeto somente poderá ser iniciado após aprovação final da Comissão Científica, através do Sistema WebGPPG.

Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP.

A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 1.790.827

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_780897.pdf	05/10/2016 16:41:47		Aceito
Outros	resposta_pendencia.docx	05/10/2016 16:41:34	TANISE VENDRUSCOLO DALMOLIN	Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_504419.pdf	05/10/2016 16:39:11	TANISE VENDRUSCOLO DALMOLIN	Aceito
Outros	Carta_aprovacao_CEUA.pdf	05/10/2016 16:38:46	TANISE VENDRUSCOLO DALMOLIN	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CE_HCPA.docx	05/10/2016 16:38:03	TANISE VENDRUSCOLO DALMOLIN	Aceito
Outros	FORMULARIO_FUNCAO.pdf	05/10/2016 11:47:03	TANISE VENDRUSCOLO DALMOLIN	Aceito
Folha de Rosto	Folha_ROsto.pdf	05/09/2016 14:42:20	TANISE VENDRUSCOLO DALMOLIN	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	material_biologico.pdf	05/09/2016 12:27:21	TANISE VENDRUSCOLO DALMOLIN	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 19 de Outubro de 2016

Assinado por:
José Roberto Goldim
(Coordenador)

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

Anexo – 2: Trabalhos publicados em colaboração não relacionados ao projeto da tese

Martins AF, Bail L, Ito CAS, da Silva Nogueira K, **Dalmolin TV**, Martins AS, Rocha JLL, Serio AW, Tuon FF. Antimicrobial activity of plazomicin against *Enterobacteriaceae*-producing carbapenemases from 50 Brazilian medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 90, n. 3, p. 228-232, 2018.

De Lima-Morales D, Avila H, Soldi T, **Dalmolin TV**, Lutz L, Aquino V, Zavascki AP, Barth AL. Rapid detection of carbapenemase production directly from blood culture by colorimetric methods: evaluation in a routine microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. v. 56, n. 9, pii e00325-18, 2018.

Lorenzoni V, **Dalmolin TV**, Franco LN, Barth AL, Horner R. Bloodstream infection by *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* from cancer patient in southern Brazil. *Braz J Infect Dis*, v. 22, n. 4, p. 356-357, 2018.

Anexo – 3: Resumos publicados em congressos

ÁVILA, H.; WINK, P. L.; DALMOLIN, T. V.; MORALES, D. L.; BARTH, A. L. Low prevalence of the *mcr-1* gene among carbapenemase producing clinical isolates of *Enterobacterales*. 6º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, São Paulo, 2018.

MAZZETTI, A.; DALMOLIN, T. V.; ÁVILA, H.; KRANICH, J.; IBRAHIM, J. C.; AREND, L.; BECKER, G. N.; KALLUF, K. L. F.; BARTH, A. L.; PILONETTO, M. Elution methods to evaluate polymyxins susceptibility. 6º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, São Paulo, 2018.

MORALES, D. L.; DALMOLIN, T. V.; AVILA, H.; BARTH, A. L. Evaluation of the rapid polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance among Brazilian isolates of *Enterobacteriaceae*. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madri, 2018.

DALMOLIN, T. V.; ÁVILA, H.; MORALES, D. L.; BARTH, A. L. Evaluation of Microelution methods to determine the susceptibility of *Enterobacteriaceae* to polymyxins. ASM Microbe, Atlanta, 2018.

DALMOLIN, T. V. Co-ocorrência dos genes *bla_{KPC-2}* e *mcr-1* em isolado clínico de *Escherichia coli* no Brasil. 2017. **Destaque como melhor apresentação oral da 37ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), 2017.**

DALMOLIN, T. V.; CASTRO, L.; MARTINS, A. F.; MORALES, D. L.; BARTH, A. L. Co-occurrence of *mcr-1* and *bla_{KPC-2}* genes in a clinical isolate of *Escherichia coli* from Brazil. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Viena, 2017.

CARNEIRO, M.; DALMOLIN, T. V.; MAGAGNIN, C.; ZAVASCKI, A. P.; BARTH, A. L. Teste NP para detecção rápida de resistência à polimixina em Enterobactérias. XII Sul Encontro de Controle de Infecção, Gramado- RS, 2017.

LOVISON, O. A.; BARRETO, F.; CASTILHOS, T. S.; DALMOLIN, T. V.; MORALES, D. L.; RAU, R.; BARTH, A. L.; MARTINS, A. F. Development of an algorithm for Real-Time identification of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

(MALDI-TOF MS). 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu-PR, 2017.

RAU, R.; MORALES, D. L.; DALMOLIN, T. V.; WINK, P. L.; RIBEIRO, A. R.; PERIN, T. F.; SCHULLER, L. K.; MARTINS, A. F.; BARRETO, F.; BARTH, A. L. First report of *Salmonella* spp. harboring the *mcr-1* gene in Brazil. 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu-PR, 2017.

DALMOLIN, T. V.; CASTRO, L.; SOLDI, T.; MORALES, D. L.; BARTH, A. L. Testes rápidos para detecção de carbapenemases direto de hemoculturas. XV Congresso Nacional de Biomedicina e III Congresso Internacional de Biomedicina, 2016.