

## RESISTÊNCIA À POLIMIXINA EM *ENTEROBACTERIACEAE* ISOLADOS NO LEPAC-UEM: INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE *MCR-1*

Leonardo Mochiutti Girardi (PIBIC/CNPq/UEM), Paula Assis Queiroz<sup>1</sup>, Katiany Caleffi-Ferracioli<sup>1</sup>, Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>1</sup>, Rubia Andreia Falleiros de Pádua<sup>1</sup>, Rosilene Fressatti Cardoso<sup>1</sup>, Vera Lucia Dias Siqueira<sup>1</sup> (Orientador), e-mail: vldsiqueira@gmail.com

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Maringá, PR.

**Área: Ciências Biológicas - 2.00.00.00-6**  
**Subárea: Microbiologia Médica - 2.12.02.01-0**

**Palavras-chave:** *mcr-1*, polimixina B, resistência bacteriana

### Resumo:

A emergência e disseminação generalizada de micro-organismos multidroga resistentes (MDR) é um desafio para a saúde pública em todo o mundo. As polimixinas são consideradas última opção terapêutica para gram-negativos MDR (GN-MDR), porém relatos de isolados resistentes às polimixinas estão em ascensão. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de genes de resistência *mcr-1* em enterobactérias produtoras de carbapenemases identificadas no setor de Bacteriologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá entre 2016 e 2017. A presença do gene foi detectada pela reação em cadeia da polimerase usando iniciadores específicos. Foram selecionados 54 isolados de enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), dos quais 18,5% (10 isolados de *K. pneumoniae*) apresentaram resistência à polimixina B, com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 8 a >128 µg/ml. Não foi identificada a presença do gene *mcr-1* em nenhum dos isolados, porém, a presença de bactérias produtoras de KPC resistentes à polimixina B com altas CIMs é alarmante, pois evidencia a falta de opções terapêuticas para infecções causadas por essas bactérias.

### Introdução

As infecções por organismos MDR têm sido uma preocupação emergente e estão associadas a aumento da mortalidade, estadias hospitalares prolongadas e aumento de custos nos cuidados de saúde. Atualmente, as polimixinas (polimixina B e colistina) são consideradas como última opção terapêutica para gram-negativos MDR (GN-MDR), porém relatos de isolados resistentes às polimixinas estão em ascensão, sobretudo

na espécie *Klebsiella pneumoniae* da família *Enterobacteriaceae* (JAYOL, 2014).

Em novembro de 2015, Liu et. al. (2015) relataram a identificação de um novo mecanismo de resistência às polimixinas mediado por um gene plasmidial, *mcr-1* (LIU, 2015). Até então, eram conhecidos apenas mecanismos de resistência a esses antimicrobianos mediados por genes cromossômicos.

No Brasil, o gene *mcr-1* foi detectado primeiramente em três amostras clínicas de *E. coli*, sendo duas provenientes de pacientes atendidos em hospitais da cidade de São Paulo/SP e uma de paciente internado em hospital do estado do Rio Grande do Norte, todas sensíveis a carbapenêmicos e com baixos níveis de resistência às polimixinas (FERNANDES, 2016).

Esses relatos indicam a disseminação global de bactérias que abrigam esta resistência à polimixinas transmitida por plasmídeos e a transferência desta resistência para espécies da família *Enterobacteriaceae* MDR que já abrigam genes de carbapenemases como *bla<sub>NDM-1</sub>* ou *bla<sub>KPC-2</sub>* é uma preocupação particular.

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a presença de genes *mcr-1* em enterobactérias produtoras de carbapenemases identificadas no setor de Bacteriologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá entre 2016 e 2017.

## Materiais e métodos

A seleção dos isolados resistentes a polimixina B foi realizada a partir da definição da concentração inibitória mínima (CIM). A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, conforme recomendado pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI), em isolados da família *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemases, identificados no Setor de Bacteriologia Clínica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Foi utilizado Sulfato de Polimixina B (Inlab, São Paulo, Brasil) em diluições seriadas de 0,250 a 128 g/ml. A interpretação foi realizada segundo pontos de corte estabelecidos pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (<http://www.eucast.org/>). Os isolados com CIM  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$  foram categorizados como susceptíveis, e aqueles com CIM  $>2$   $\mu\text{g/ml}$  foram considerados resistentes.

Todos os isolados foram testados para a presença do gene *mcr-1*. Um isolado clínico de *Escherichia coli*, cedido pela Universidade de São Paulo (USP), sabidamente positivo para o gene *mcr-1* foi utilizado como controle positivo para padronização da técnica de *Polimerase Chain Reaction* (PCR). Foram utilizados os iniciadores CLR F 5'CGGTTCAGTCCGTTTGTTC'3 e CLR R 5'CTTGGTCGGTCTGTAGGG'3 para amplificação do gene *mcr-1*, conforme metodologia descrita por Liu et. al. (2015) (LIU, 2015).

## Resultados e Discussão

De acordo com os objetivos propostos para este projeto, foram selecionadas 54 bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemase do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), 52 *Klebsiella pneumoniae* e duas *Escherichia coli*.

O perfil de resistência desses isolados foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. Como resultado, 18,5% (n = 10) dos isolados bacterianos apresentaram resistência à polimixina B, todos da espécie *Klebsiella pneumoniae* (Tabela I), com CIM variando de 8 a >128 µg/ml. Em relação aos isolados sensíveis (81,5%, n = 44: 42 *K. pneumoniae* e 2 *E. coli*), a CIM frente à polimixina variou de <0,25 a 1 µg/ml.

**Tabela I.** Concentração inibitória mínima (µg/ml) e detecção molecular de *mcr-1* em 10 isolados resistentes à Polimixina B, identificados no Setor de Bacteriologia Clínica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC):

Espécie	Sítio de isolamento	Carbapenemase	<i>mcr-1</i>	CIM Polimixina B (µg/ml)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Swab retal	KPC	NEG	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina – SVD	KPC	NEG	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Swab retal	KPC	NEG	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Swab retal	KPC	NEG	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina – SVD	KPC	NEG	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Swab retal	KPC	NEG	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina – SVD	KPC	NEG	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina – SVD	KPC	NEG	> 128
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina – SA	KPC	NEG	>128
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Swab retal	KPC	NEG	>128

Ponto de corte estabelecido pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Polimixina (S ≤ 2; R > 2). Abreviações: CIM: concentração inibitória mínima. R: resistente. S: sensível. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. NEG: negativo. SVD: sonda vesical de demora. SA: sonda de alívio.

O gene *mcr-1* não foi detectado neste estudo. Esse fato pode ser devido ao número limitado de bactérias e à baixa prevalência do gene *mcr-1* observada em isolados de origem humana. Nos últimos anos, relatos da presença do gene *mcr-1* em diferentes espécies de enterobactérias no Brasil, como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Salmonella enterica* têm aumentado, mas permanecem mais prevalentes na espécie *E. coli* (BARTOLLETTI, 2016; RAU, 2018).

Neste estudo não avaliamos mecanismo cromossômico de resistência à polimixina, no entanto, a resistência à este antimicrobiano nos 10 isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC é provavelmente causada pela perda da função de *mgrB* ou pela presença de substituições não sinônimas no *pmrB*, resultando na modificação do lipídio A (JAYOL, 2014). Todos esses genes estão localizados no cromossomo bacteriano.

## Conclusões

Nesse estudo não identificamos a presença do gene *mcr-1* como mecanismo de resistência nas enterobactérias resistentes a polimixina B identificadas no LEPAC-UEM. Apesar disso, a presença de bactérias produtoras de KPC resistentes à polimixina B com altas CIMs é alarmante, pois evidencia a falta de opções terapêuticas para infecções causadas por essas bactérias. Há uma crescente necessidade em identificar e monitorar esses mecanismos de resistência, que se apresentam como um novo desafio no tratamento de micro-organismos MDR.

## Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de Pesquisa de Iniciação científica;  
Aos colaboradores do Laboratório de Bacteriologia Médica/DAB/UEM

## Referências

- BARTOLLETTI, F. et al. Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, Sao Paulo, Brazil. **Emerg infect dis**, v. 22, n. 10, p. 1849, 2016.
- FERNANDES, M. R. 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**, v. 60, n. 10, p. 6415-7, Oct 2016.
- JAYOL, A. et al. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 8, p. 4762-6, Aug 2014.
- 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, n. 2, p. 161-8, Feb 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.