



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

RAUANA LINS DE ANDRADE

**ANÁLISE DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A POLIMIXINA EM ISOLADOS
DE *Klebsiella pneumoniae***

**RECIFE, PE
2021**

RAUANA LINS DE ANDRADE

**ANÁLISE DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A POLIMIXINA EM ISOLADOS
DE *Klebsiella pneumoniae***

Monografia apresentada à coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, sob orientação da professora Dra. Anna Carolina Soares Almeida e co-orientação da Ma. Bárbara Nazly Rodrigues Santos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas de acordo com as exigências.

**RECIFE, PE
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A553a Andrade, Rauana Lins
 ANÁLISE DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A POLIMIXINA EM ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* /
 Rauana Lins Andrade. - 2021.
 52 f. : il.

 Orientadora: Anna Carolina Soares Almeida.
 Inclui referências e anexo(s).

 Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em
 Ciências Biológicas, Recife, 2021.

 1. Resistência bacteriana. 2. mutação. 3. sistemas de dois componentes. 4. Polimixina. I. Almeida, Anna Carolina
 Soares, orient. II. Título

CDD 574

RAUANA LINS DE ANDRADE

**ANÁLISE DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A POLIMIXINA EM ISOLADOS
DE *Klebsiella pneumoniae***

Monografia apresentada à
coordenação do curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas, sob orientação da
professora Dra. Anna Carolina Soares
Almeida e co-orientação da Ma. Bárbara
Nazly Rodrigues Santos, da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como
requisito para obtenção do título de bacharel
em Ciências Biológicas de acordo com as
exigências.

BANCA EXAMINADORA

APROVADO EM 17/12/2021

Profa. Dra. Anna Carolina Soares Almeida, Dra. em Genética, (UFRPE)

Paula Mariana Salgueiro de Souza, Mestre em Biologia Celular e Molecular Aplicada, (UPE)

Michelly Maria Pereira e Oliveira, Graduada em Bacharelado em Ciências Biológicas, (UFRPE)

RECIFE, PE

2021

Dedico aos meus pais Maria e José, e meu avô (Doutor) minhas inspirações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado força em todos os momentos difíceis da minha vida acadêmica, por ter superado cada obstáculo em meu caminho.

Aos meus amados pais Maria José Lins de Andrade e José Gomes de Andrade pela compreensão e apoio em todos os momentos. Ao meu avô José Lins Filho que é a melhor pessoa do mundo, meu porto seguro, meu simbolismo de humildade e me ensina muito sobre a vida. Ao meu namorado Cristiano Corrêa o meu amor e aos demais familiares que tiveram contribuição para essa graduação.

A minha orientadora Profa. Anna Carolina Almeida pelos ensinamentos repassados, pela confiança e pelo apoio, a gratidão sempre será o principal sentimento que carregarei comigo. As doutorandas Bárbara Nazly e Paula Salgueiro, que também fazem parte desse trabalho, obrigada pelos ensinamentos, por todas as ajudas.

Ao grupo de Resistência Microbiana (GRM), pela oportunidade, aprendizado adquirido, pelo apoio e pelo companheirismo.

A Celma, seu Abel e toda sua família, a Aline e sua família, Alex Leis, Deibson Belo e Manuela Menezes que me deram muito apoio e conselhos, fizeram total diferença ao decorrer da minha graduação.

Agradeço aos professores e colegas do Curso Bacharelado em Ciências Biológicas pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados. Todos tiveram contribuição direta para o meu crescimento profissional e para a obtenção desse título. A caminhada foi árdua, mas valeu a pena. A UFRPE sempre será minha casa, não é à toa que tem título de mãe, e sempre vai fazer parte da minha história.

Eu sou da terra onde o viver é arte
E a vida insiste em ser por toda parte
Sou mais um fruto vindo do sertão.

(Antonio Marinho)

RESUMO

As Infecções por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase têm sido um problema de saúde pública levando ao aumento da morbidade e mortalidade de pacientes, o que levou a reintrodução de um antimicrobiano previamente descontinuado para uso humano, as polimixinas. O aumento da resistência às polimixinas tem dificultado ainda mais o tratamento, o que é preocupante devido à alta disseminação mundial dessas cepas. Este estudo teve como objetivo realizar a análise genética dos sistemas de dois componentes envolvidos na resistência a polimixina em isolados de *Klebsiella pneumoniae*. Foram estudados 16 isolados de *K. pneumoniae* multirresistentes. A relação clonal foi realizada a partir da investigação de sequências palindrômicas extragênicas repetidas (REP). Os genes dos sistemas reguladores enzimáticos de dois componentes (*pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ*) foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR). A identificação das mutações foi realizada por sequenciamento de DNA com análise comparativa utilizando a cepa MGH 78578 como referência. Foi possível distinguir a presença de quatro grupos com relação clonal da mesma espécie com variação de 2 a 5 bandas não compartilhadas, indicando um padrão de similaridade entre todas as bactérias do estudo. Todos os isolados apresentaram mais de uma mutação nas regiões codificantes dos genes estudados, a prevalência foi de mutações classificadas como silenciosas em *pmrA* e *phoP*. Porém mutações do tipo *Frameshift Nonsense* e *Missense* foram identificadas, nos genes *pmrB* e *phoQ* o que levou a alterações na cadeia de aminoácidos e produção de uma proteína não funcional. As alterações nucleotídicas nas regiões codificantes dos genes reguladores dos TCS (*phoPQ* e *pmrAB*) e o comprometimento da sequência proteica, são considerados os mecanismos mais relevantes no que diz respeito a mediação da resistência às polimixinas.

Palavras-chave: Resistência bacteriana; mutação; sistemas de dois componentes; polimixina.

ABSTRACT

Infections for *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-producing have been a public health problem leading to increased patient morbidity and mortality, which has led to the reintroduction of a previously discontinued antimicrobial for human use, polymyxins. The raise in resistance to polymyxins has made treatment even more difficult, which is worrying due to the high worldwide dissemination of these strains. This study aimed to perform a genetic analysis of two-component systems involved in polymyxin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates. Sixteen multiresistant *K. pneumoniae* isolates were studied. The clonal relationship was performed from the investigation of repeated extragenic palindromic sequences (REP). The genes of the two-component enzyme regulatory systems (*pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ*) were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The identification of mutations was performed by DNA sequencing with comparative analysis using the MGH 78578 strain as reference. It was possible to distinguish the presence of four groups with clonal relationship of the same species with a variation of 2 to 5 unshared bands, indicating a pattern of similarity between all bacteria in the study. All isolates had more than one mutation in the coding regions of the genes studied, the prevalence was of mutations classified as silent in *pmrA* and *phoP*. However, Frameshift Nonsense and Missense mutations were identified in *pmrB* and *phoQ* genes, which led to alterations in the amino acid chain and production of a non-functional protein. Nucleotide alterations in the coding regions of the TCS regulatory genes (*phoPQ* and *pmrAB*) and the compromise of the protein sequence are considered the most relevant mechanisms regarding the mediation of resistance to polymyxins.

Keywords: Bacterial resistance; mutation; two-component systems; polymyxin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Item	Página
Figura 1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> cultivada em meio de cultura sólido, geralmente crescem em colônias médias a grandes, e aspecto mucóide.	15
Figura 2 Esquema representativo dos mecanismos de ação dos antimicrobianos e seus principais alvos.	17
Figura 3 Composição e estrutura química das polimixinas. Segue respectivamente a colistina e polimixina B.	19-20
Figura 4 Representação esquemática dos mecanismos antibacterianos de polimixina	21
Figura 5 Os sistemas CrrAB, PmrAB e PhoPQ induzem a expressão de pmrC e pmrHFIJKLM, que geram mudanças no LPS. Esses sistemas são regulados por MgrB, CrrC e PmrD. MgrB faz a regulação negativa, enquanto que CrrC e PmrD fazem regulação positiva. Mutações ou interrupções nesses componentes podem levar a uma regulação anormal resultando em um aumento da modificação do LPS associada ao operon pmrHFIJKLM e pmrC.	25
Figura 6 Domínios destacados da proteína PmrB com cinco regiões com funções bioquímicas determinadas, conforme ferramenta SMART.	34
Figura 7 Domínios destacados da proteína PhoQ com quatro regiões com funções bioquímicas determinadas, os retângulos em azul representam as regiões transmembranas, conforme a ferramenta SMART.	34
Figura 8 Gel de eletroforese com produto da REP-PCR. M- marcador molecular de 100pb, Pol1-Pol21 perfil de REP-PCR dos isolados bacterianos de <i>K. pneumoniae</i> .	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Análise <i>in silico</i> gene <i>pmrA</i> região codificante de 672pb.	39
Tabela 2 Análise <i>in silico</i> gene <i>pmrB</i> região codificante de 1098pb.	39-40
Tabela 3 Análise <i>in silico</i> gene <i>phoP</i> região codificante de 672pb.	40
Tabela 4 Análise <i>in silico</i> gene <i>phoQ</i> região codificante de 1467pb.	41

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- Al³⁺ – Íon Alumínio
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- bla – Gene de uma Beta-lactamase
- Ca²⁺ – Íon Cálcio
- CAMP – Antimicrobianos Catiônicos
- CRKP – *K. pneumoniae* com resistência aos carbapenêmicos
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CTX-M – Beta-Lactamase tipo Cefotaximase
- Dab – Ácido Diaminobutírico
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- ECDC – Centro Europeu de Prevenção e Controle das Doenças (do inglês “European Center for Disease Prevention and Control”)
- ESBLs – Beta-lactamase de Espectro Estendido (do inglês, “Extended Spectrum Betalactamase”)
- Fe³⁺ – Íon Férreo
- KPC – *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase
- Lara4N – 4-aminodeoxi-L-arabinose
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MBL – Metallo-Beta-Lactamase
- MCR – Resistência a Colistina Mobilizável (do inglês, “Mobile Colistin Resistance”)
- MDR – Resistência a múltiplas drogas (do inglês, “multidrug resistant”)
- Mg²⁺ – Íon Magnésio
- NDM – Nova Delhi Metallo-beta-lactamase (do inglês, “New Delhi Metalobetalactamase”)
- OXA – Oxacilinase
- PAPs – Perfis de análise populacional
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, “Polymerase Chain Reaction”)
- PDR – Pan droga resistente (do inglês, “pandrug resistente”)
- pEtN – Fosfoetanolamina
- pH - Potencial hidrogeniônico
- SHV - Beta-lactamase tipo variável reagente Sulfhydryl (do inglês, “Betalactamase tipo Sulfhydryl reagent variable”)
- ST - Sequência tipo (do inglês “Sequence type”)
- TEM - Beta-lactamase tipo Temoniera
- UTI – Unidade de Terapia Intensiva
- XDR - Extensivamente droga resistente (do inglês, “extensively drugresistant”)
- Zn²⁺ - Íon Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 INFECÇÕES POR <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
2.2 ANTIMICROBIANO E RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	16
2.2.1 POLIMIXINAS.....	18
2.2.2 MECANISMO ANTIBACTERIANO DA POLIMIXINA	20
2.2.3 MECANISMO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA AS POLIMIXINAS	21
2.2.4 SISTEMA DE DOIS COMPONENTES <i>pmrA- pmrB</i>	22
2.2.5 SISTEMA DE DOIS COMPONENTES <i>phoP- phoQ</i>	23
2.2.6 OPERON <i>pmrCAB</i>	23
2.2.7 OPERON <i>pmrHFIJKLM</i> E O GENE <i>pmrE</i>	23
2.2.8 GENE <i>mgrB</i>	23
2.2.9 SISTEMA DE DOIS COMPONENTES <i>crrA-crrB</i>	24
2.3.0 GENE <i>mcr</i>	25
2.3.1 CÁPSULA POLISSACARÍDICA (CPS) ASSOCIADA A RESISTÊNCIA	26
A POLIMIXINA	
3.0 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA À POLIMIXINA EM.....	26
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 GERAL	
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	
4. METODOLOGIA.....	30
4.1 LINHAGENS BACTERIANA.....	30
4.2 ANÁLISE DA CLONALIDADE.....	30
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO.....	30
4.4 AMPLIFICAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA	30
4.5 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR.....	31
4.6 ANÁLISES <i>in silico</i> DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS.....	31
4.7 FERRAMENTA SMART E PROVEAN.....	32
5. RESULTADOS.....	33
6. DISCUSSÃO.....	36
7. CONCLUSÃO.....	38
8. ANEXOS.....	39
9. REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

O aumento das infecções causadas por bactérias Gram-negativas resistentes a múltiplas drogas (MDR) é alarmante, representa uma ameaça à assistência médica e tornou-se um dos maiores desafios terapêuticos (ECDC, 2016). Nesse contexto, a espécie *Klebsiella pneumoniae* tem ganhado destaque, principalmente devido à sua distribuição global (RUSSOTTO *et al.*, 2015). Por muitos anos, os antimicrobianos carbapenêmicos, pertencentes à classe dos beta-lactâmicos, foram considerados os fármacos de escolha para tratamento das infecções causadas por *K. pneumoniae* MDR (LEE *et al.*, 2016). No entanto, a pressão seletiva exercida pelo uso exacerbado dessas drogas favoreceu a emergência de *K. pneumoniae* com resistência aos carbapenêmicos (CRKP), a qual é mediada principalmente pela ação da enzima *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC). As opções de tratamento para infecções causadas por CRKP são restritas e a alta prevalência dessas cepas em ambiente hospitalar levou a reintrodução de um grupo de antimicrobianos previamente descontinuado para uso humano, as polimixinas (JEANNOT *et al.*, 2017).

A polimixina B e polimixina E ou colistina, são as drogas da classe das polimixinas utilizadas no tratamento de infecções em seres humanos (BISWAS *et al.*, 2014). Esses fármacos são anfipáticos e atuam interagindo com componentes da membrana celular negativamente carregados, como os lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolipídeos, resultando no deslocamento dos íons de Ca^{2+} e Mg^{2+} , levando a inserção da cauda lipofílica presente na molécula do antimicrobiano e ao desarranjo e desestabilização da membrana, ruptura, perda do conteúdo citoplasmático e conseqüentemente morte celular (GIRARDELLO *et al.*, 2012).

As taxas de resistência às polimixinas até pouco tempo eram consideradas baixas, porém, mecanismos de resistência a essas drogas já vêm sendo amplamente relatados em isolados que eram normalmente susceptíveis, especialmente quando se trata da resistência à colistina em isolados de *K. pneumoniae* (OLAITAN *et al.*, 2014). A falta de susceptibilidade desse fármaco é mediada por modificações químicas no lipídeo A, componente do LPS bacteriano, através da adição de compostos como amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) e fosfoetanolamina (pEtN). A síntese e transferência de L-Ara4N e pEtN é mediada por sistemas reguladores enzimáticos de dois componentes (TCSs), os quais são ativados por estímulos ambientais. Os sistemas PhoP-PhoQ (PhoPQ) e o PmrA-PmrB (PmrAB) são os

principais na contribuição da resistência à polimixina, geralmente após a ocorrência de mutações específicas nesses TCSs (BARON *et al.*, 2016; OLAITAN *et al.*, 2014).

Em resposta á concentrações sub-letais de polimixina, enzimas com atividade de tirosina quinase como PhoQ e PmrB, fosforilam as proteínas reguladores citoplasmáticas PhoP e PmrA, que por sua vez, modulam a expressão de genes alvos como o *pmrC*, contido no operon *pmrCAB*, o *pmrE* e o operon *arnBCADTEF*, os quais codificam as enzimas modificadoras do LPS. Além desses, um novo TCS denominado CrrAB também foi descrito como mediador da resistência a polimixina em *K. pneumoniae*, sendo composto por uma histidina quinase (CrrB) e seu regulador de resposta (CrrA) (BARON *et al.*, 2016). Numerosas mutações já foram descritas nos genes envolvidos na resistência à polimixina. A inativação do gene *mgrB* por meio de mutações e truncamento por elementos de inserção é o mecanismo mais frequente em *K. pneumoniae*. (JAYOL *et al.*, 2015; AIRES *et al.*, 2016; GIORDANO *et al.*, 2018). Há poucos anos, também foi relatado o surgimento do primeiro mecanismo de resistência a polimixina codificado por um gene de localização plasmidial (*mcr-1*), o qual já sofreu disseminação intercontinental e tem sido encontrado em várias espécies bacterianas e associados a diferentes ambientes genéticos (LIU *et al.*, 2016).

As infecções causadas por *K. pneumoniae* MDR caracterizam-se como um problema de saúde pública crescente, levando ao aumento da morbidade e mortalidade de pacientes, prolongamento do tempo de internação e gastos com insumos. Nesse cenário, as polimixinas são as drogas de última alternativa e a resistência a esse grupo de fármacos costuma ser preocupante devido à alta disseminação mundial dessas cepas. Então, faz-se necessário a realização de estudos que caracterizem os respectivos mecanismos regulatórios de resistência a esse grupo de fármaco.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFECÇÕES POR *Klebsiella pneumoniae*

A espécie *Klebsiella pneumoniae* pertencente à família Enterobacteriaceae e ordem Enterobacteriales, é um bacilo Gram-negativo que faz parte da microbiota intestinal normal. Há muito tempo foi reconhecido como um agente de doença (descrito pela primeira vez por Carl Friedländer em 1882, como causa de pneumonia), e permanece entre os patógenos nosocomiais mais comuns do mundo (WYRES *et al.*, 2020).

K. pneumoniae é imóvel, não esporulado, encapsulado, aeróbio facultativo, porém apresenta melhor crescimento em condições aeróbias. Seu tamanho varia de 0,3 a 1 μ de diâmetro e de 0,6 a 6 μ de comprimento. Quando cultivada em meio de cultura sólido, as colônias formadas são grandes e mucóides (Figura 1), indicando a presença de uma cápsula polissacarídica que recobre toda a superfície bacteriana conferindo proteção contra a fagocitose por granulócitos e contra a ação de fatores bactericidas do soro, além de auxiliar na aderência (MEYER E PICOLI, 2011).

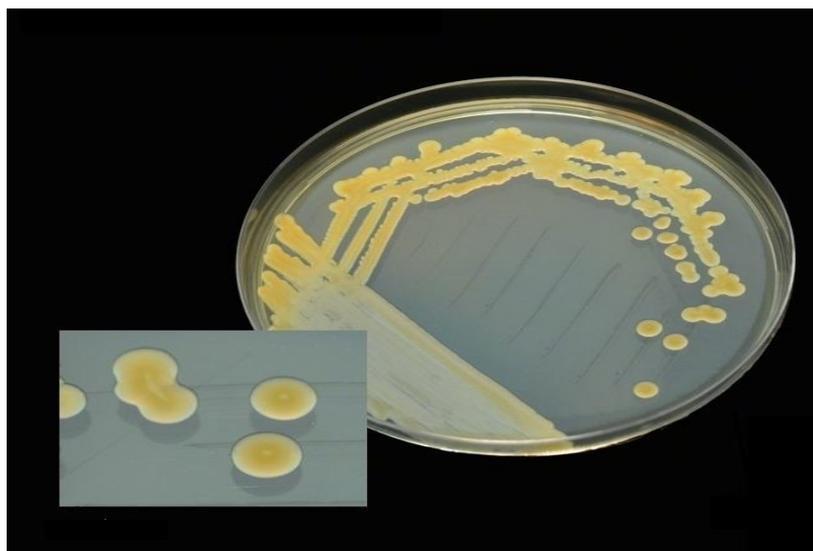


Figura 1. *Klebsiella pneumoniae* cultivada em meio de cultura sólido, geralmente crescem em colônias médias a grandes, e com aspecto mucóide. Fonte: American Society for Microbiology (2005).

A maioria das infecções por *K. pneumoniae* em todo o mundo são infecções oportunistas, as manifestações mais comuns são pneumonia, infecções do trato urinário e feridas cirúrgicas, qualquer uma das quais pode progredir para a bacteremia. O maior risco são em pacientes vulneráveis, grupos como neonatos, idosos e os imunocomprometidos, principalmente aqueles que estão em unidade de terapia intensiva (UTI). Nos quais as infecções são consideradas como resultado de crescimento excessivo e falta de controle imunológico (WYRES *et al.*, 2020).

A alta prevalência deste patógeno em ambiente hospitalar está relacionada ao fato de apresentarem uma ampla gama de fatores de virulência, aumentando o seu potencial patogênico, assim como o fluxo de pacientes submetidos a cirurgias, o longo tempo de internação, doença de base, uso de cateteres urinários e venosos, ventilação mecânica, estado imunológico, idade e uso de medicações imunossupressoras; com isso, os pacientes se tornam mais susceptíveis a adquirir infecções. Além disso, o tratamento empírico com antibióticos pode contribuir para uma elevada taxa de resistência aos antimicrobianos, dificultando o tratamento do paciente, favorecendo o estabelecimento e disseminação desses isolados (MOTA *et al.*, 2018).

A infecção por *K. pneumoniae* em ambientes hospitalares apresenta altas taxas de morbimortalidade, e atualmente o desenvolvimento dessas bactérias resistentes a diversos antimicrobianos é considerado um problema de saúde pública a nível mundial, o qual está relacionado à extensa distribuição de várias das suas espécies em ambientes diversos que são amplamente habitados pelo homem, somado ao uso indiscriminado de antimicrobianos pela população, fato que dificulta ainda mais a farmacoterapia com os antibióticos disponíveis para o tratamento (AGUIAR *et al.*, 2020).

2.2 ANTIMICROBIANO E RESISTÊNCIA BACTERIANA

A descoberta, comercialização e administração rotineira de compostos antimicrobianos para tratar infecções revolucionaram a medicina moderna e mudaram o paradigma terapêutico. De fato, os antibióticos tornaram-se uma das intervenções médicas mais importantes necessárias para o desenvolvimento de abordagens médicas complexas, como procedimentos cirúrgicos de ponta, transplante de órgãos sólidos e manejo de pacientes com câncer, entre outros. Infelizmente, o aumento acentuado da resistência antimicrobiana entre patógenos bacterianos comuns está agora ameaçando essa realização terapêutica, comprometendo os resultados bem sucedidos de pacientes gravemente doentes (MUNITA e ARIAS, 2016).

Para um antimicrobiano apresentar atividade, é preciso que ele entre em contato com a célula bacteriana e encontre seu sítio de ação, o qual deve estar acessível e inalterado (Cooksey, 1998). Os mesmos são classificados com base no componente celular ou sistema que afetam, como antimicrobianos indutores da morte celular (fármacos bactericidas) ou como inibidores do crescimento celular (fármacos bacteriostáticos). A maioria dos antimicrobianos bactericidas atuais inibem a síntese de ácidos nucleicos, a síntese da parede celular ou a síntese de proteínas (KOHANSKI *et al.*, 2010). Na figura 2 está a representação dos principais grupos de fármacos e seus respectivos mecanismos de ação.

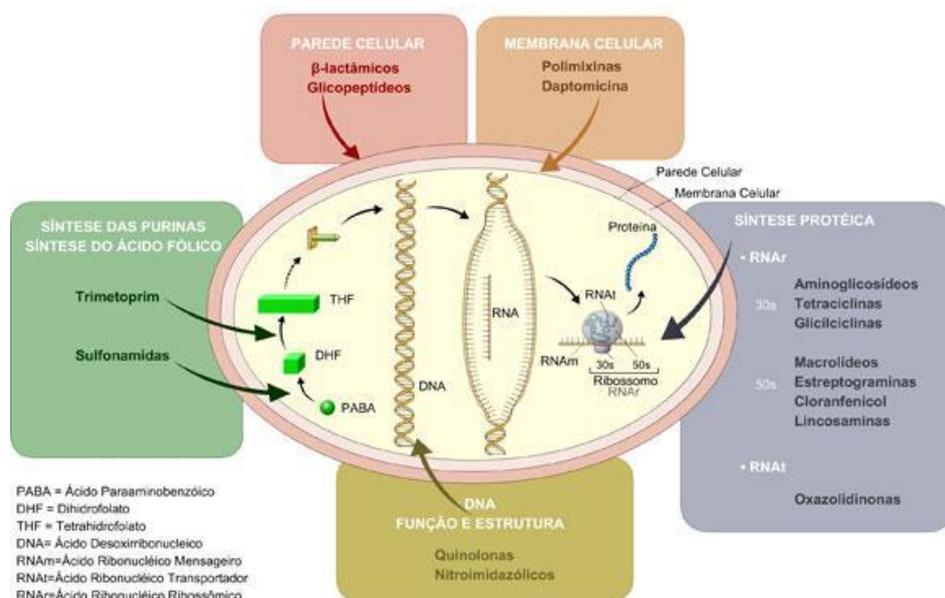


Figura 2. Esquema representativo dos mecanismos de ação dos antimicrobianos e seus principais alvos. Fonte: Anvisa, 2007.

Os agentes antimicrobianos no tratamento de doenças infecciosas podem ser divididos em aqueles obtidos de microrganismos (naturalmente), chamados de antibióticos e os obtidos não naturalmente, apresentando compostos químicos sintéticos e semi-sintéticos chamados de quimioterápicos. As bactérias que compartilham o mesmo nicho ecológico com esses organismos produtores de antimicrobianos, desenvolveram mecanismos antigos para suportar o efeito da molécula de antibiótico prejudicial e, conseqüentemente, sobreviver em sua presença. Assim, esses organismos são considerados "intrinsecamente" resistentes a um ou mais antimicrobianos (MUNITA e ARIAS, 2016). Segundo Liu e colaboradores (2016), tal insensibilidade intrínseca pode ser devido à falta de afinidade da droga para o alvo bacteriano, inacessibilidade da droga na célula bacteriana, ou extrusão da droga por moléculas codificadas cromossomicamente com atividades de exportação ativas.

Outro mecanismo de resistência bem elucidado é considerado como "resistência adquirida", é definida como um processo pelo qual a bactéria que era originalmente susceptível ao composto antimicrobiano torna-se resistente ao mesmo. O desenvolvimento desse tipo de resistência pode ser resultado de mutações em genes cromossômicos que são repassadas da célula-mãe para célula-filha (transferência vertical) ou devido à aquisição de determinantes genéticos externos de resistência, comumente obtidos de organismos intrinsecamente resistentes presentes no meio ambiente (resistência horizontal) (MUNITA e ARIAS, 2016).

A coexistência de diferentes mecanismos de resistência em um único isolado bacteriano contribui para o fenótipo de resistência a múltiplas drogas ("multidrug resistant"-MDR), até mesmo microorganismos, extensivamente resistentes a medicamentos ("extensively drug-resistant" - XDR) ou isolados pan resistentes a drogas

((“pandrug-resistant” - PDR). Assim, o padrão geral de resistência apresentado nos relatórios laboratoriais reflete as características intrínsecas de resistência da espécie combinadas com qualquer traço adicional de resistência adquirido pelo isolado. (JARLIER *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, a taxa de detecção de microrganismos amplamente resistentes tem aumentado em níveis alarmantes, e este aumento é atribuído a uma combinação de características microbianas, pressão seletiva causada pela má utilização dos agentes antimicrobianos, e principalmente, a disseminação de genes de resistência (BLAIR *et al.*, 2015). Muitos dos antimicrobianos que são comercializados já não possuem grande eficácia terapêutica, isso acaba acarretando um aumento significativo nos custos médicos, devido ao uso de fármacos mais caros, além do prolongamento no tempo de tratamento dos pacientes, levando a estadias mais longas nos hospitais e ocasionando altas taxas de morbidade e mortalidade (HOGBERG *et al.*, 2010).

Nesse estudo daremos ênfase nos antimicrobianos utilizados na terapia clínica para debelar infecções causadas por *k. pneumoniae* multidroga resistente, assim como a evolução dos mecanismos de resistência que a mesma expressa. Será abordado a reintrodução das polimixinas, que até então possuía excelente atividade contra bactérias Gram-negativas, incluindo aquelas que apresentam resistência aos carbapenems, e como atualmente esse grupo de fármacos não são mais eficazes, se tornando um grave problema de saúde pública de âmbito mundial.

2.2.1 POLIMIXINAS

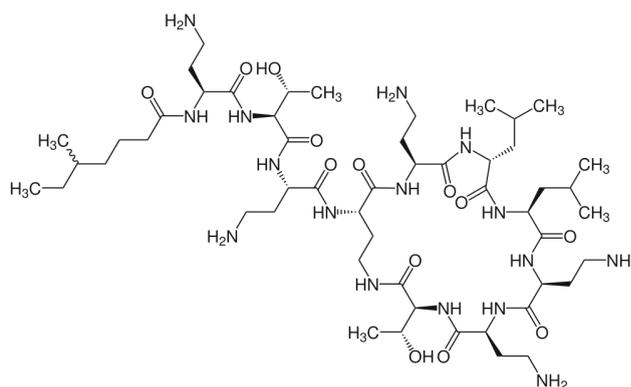
As polimixinas constituem uma classe de antimicrobianos polipeptídicos cíclicos, a qual é formada por um grupo de cinco diferentes compostos: A, B, C, D e E, diferenciando-se quanto às sequências de aminoácidos e as cadeias laterais de ácidos graxos que compõem sua estrutura química (FALAGAS *et al.*, 2005). Existem duas polimixinas disponíveis para uso clínico, colistina (ou seja, polimixina E) e polimixina B ambas, apresentam a mesma atividade *in vitro*, com diferença apenas em sua composição química. Foram descobertas pela primeira vez no final da década de 1940, (produzidas por sistemas de síntese de peptídeos não ribossômicos em bactérias Gram-positivas como a *Paenibacillus polymyxa*), e a colistina foi isolada a partir da espécie *Bacillus colistinus*. As demais não são utilizadas clinicamente devido à sua alta taxa de toxicidade (VELKOV *et al.*, 2013; NANG *et al.*, 2021).

Sua estrutura química compõe uma mistura de grupos lipofílicos e hidrofílicos o que torna as polimixinas anfipáticas, uma propriedade físico-química essencial para sua atividade antibacteriana. Sua composição se assemelha à dos peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPs) (defensinas e gramicidinas), apresentam um núcleo decapeptídico que contém um ciclo intramolecular de heptapeptídeos ligado a amido entre o grupo amino da cadeia lateral do resíduo de ácido diaminobutírico (Dab) na posição 4 e o grupo carboxil no resíduo de treonina C-terminal (Figura 3). Possuem também várias outras características estruturais distintas, incluindo cinco resíduos não proteogênicos de Dab (α,γ -ácido-diaminobutírico)

que são carregados positivamente a pH fisiológico (figura 3) (ROBERTS *et al.*, 2015; BERGEN *et al.*, 2005).

Até a década de 1960 essas drogas eram as opções terapêuticas usadas para infecções graves por bactérias Gram-negativas, no entanto, elas apresentavam altas taxas de nefrotoxicidade e neurotoxicidade associada ao seu uso prolongado. Dessa forma, a partir da década de 1970, as polimixinas passaram, gradativamente, a ser substituídas por cefalosporinas de amplo espectro e aminoglicosídeos que apresentavam o mesmo espectro de atividade, mas com menor toxicidade do que as mesmas. Até a década de 1990, as polimixinas eram utilizadas somente em formulações tópicas e no tratamento de infecções leves (GIRARDELLO; GALES, 2012).

Além do uso em medicina humana, as polimixinas também têm sido utilizadas extensivamente na medicina veterinária para tratamento e prevenção de doenças infecciosas causadas por enterobactérias, as quais são bastante comuns, e ainda para a promoção do crescimento animal. Esse fato tem causado grande preocupação devido aos relatos recentes de enterobactérias portando determinantes de resistência às polimixinas em animais e produtos alimentares, bem como a sua propagação para humanos, sendo essa uma das principais causas da disseminação da resistência a esse grupo de fármacos (CATRY *et al.*, 2015).. 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 E WU, 2016, TANISE, 2018).



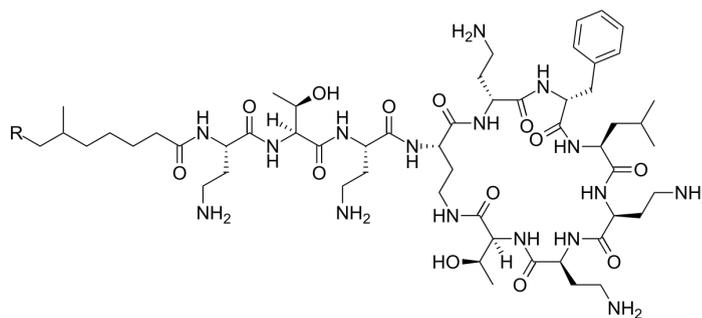


Figura 3. composição e estrutura química das polimixinas. Segue respectivamente a colistina e polimixina B. Fonte: Google imagens

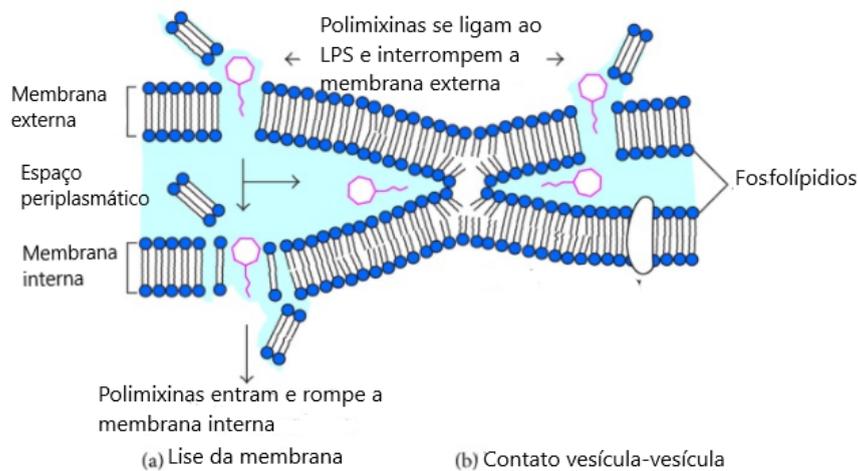
2.2.2 MECANISMO ANTIBACTERIANO DA POLIMIXINA

Em bactérias Gram-negativas, a membrana externa age como uma barreira de permeabilidade. O alvo inicial da polimixina é o lipopolissacarídeo (LPS) localizado sobre a membrana externa. O LPS é composto por três domínios: lipídio A mais interno, região de oligossacarídeo central (cerne polissacarídico) e a cadeia de polissacarídeos O, mais externo. Entre eles, o domínio mais importante é o lipídio A e é composto por fosfolipídios baseados em moléculas de glicosamina, que serve como uma âncora para estabilizar a estrutura geral da membrana externa. O núcleo de oligossacarídeo é dividido em duas porções (externa e interna), sendo constituído de heptose e resíduos de ácido 3-deoxi-D-manno-oct-2-ulosônico (KDO). Cátions divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} geralmente servem como uma ponte entre as moléculas do LPS adjacentes para estabilizar a monocamada (YU *et al.*, 2015; NIKAIDO, 2003).

Estudos mostram que o modo de ação da polimixina acontece por um mecanismo de “absorção auto-promovida”. A natureza anfipática desse antimicrobiano é crucial para permitir sua absorção através da membrana externa. Neste modelo, a protonação de amins livres presente nos resíduos das polimixinas fornece um meio de atração eletrostática entre grupos fosfato (aniônicos) presentes no LPS. Ocorrendo o deslocamento de cátions divalente (Ca^{2+} e Mg^{2+}), assim permitindo a inserção da cauda lipofílica presente na molécula das polimixinas, (de polimixina B e colistina, respectivamente). A inserção atua para enfraquecer a junção do lipídio A, conseqüentemente ocasionando assim o desarranjo e a desestabilização da membrana externa. Esse desarranjo leva ao aumento da permeabilidade na célula bacteriana, a qual permite maior absorção do antimicrobiano, bem como extravasamento do conteúdo celular e, em seguida, a morte celular bacteriana devido ao desequilíbrio osmótico (VELKOV *et al.*, 2013).

Outro mecanismo de ação alternativo apresentado por Yu et al, 2015, é que a polimixina possa mediar o contato entre o espaço periplasmático entre a membrana interna e externa. A estrutura complexa da membrana externa e interna consistem em um folheto fosfolipídico que contém predominantemente LPS, proteínas e lipoproteínas. A polimixina pode se ligar a duas membranas através de vesículas de fosfolipídios aniônicos (via de

contato vesícula-vesícula), e, promovendo a troca desses fosfolípidios entre vesículas. Em resumo, com a ajuda da interação eletrostática e dois domínios hidrofóbicos, a molécula de polimixina pode entrar e cruzar a membrana externa. Em seguida, a polimixina irá induzir a troca lipídica entre os folhetos da membrana interna e externa, desencadeando a perda de especificidade da composição fosfolipídica. Isso pode causar um desequilíbrio osmótico, levando à lise celular. A figura 4 mostra o esquema desses dois mecanismos de ação: a) mecanismo clássico de lise de membrana e b) Mecanismo alternativo de contato vesícula-vesícula.



Fonte: YU et al., 2015

2.2.3 MECANISMO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA ÀS POLIMIXINAS

A colistina é considerada um dos antibióticos de último recurso usados para o tratamento de infecções críticas causadas por patógenos gram-negativos multidroga resistentes. Porém no cenário atual há inúmeros relatos do surgimento da resistência à colistina em pacientes, a maioria dos quais já havia recebido terapia de colistina ou com aquisição via transmissão nosocomial (OLAITAN *et al.*, 2016). Os principais mecanismos de resistência a polimixina inclui: alteração da porção do lipopolissacarídeo (LPS), resultando em uma redução da carga negativa líquida do LPS; mutações em genes; aumento do efluxo de drogas; via de porina reduzida, formação de cápsulas e inativação enzimática do antibiótico (colistina). No entanto, outros mecanismos de resistência à polimixina também foram descritos (por exemplo, mecanismos de defesa antioxidante, hipervesiculação) (MLYNARCIK e KOLAR, 2018).

O mecanismo mais elucidado e bem relatado sobre resistência à polimixina em bactérias Gram-negativas, principalmente *K. pneumoniae* envolve a regulação constitutiva de uma série de sistemas regulatórios. A membrana externa, como foi dito, serve como uma barreira de permeabilidade para proteger bactérias Gram-negativas de vários antibióticos e

produtos químicos. O passo crítico da atividade bactericida da polimixina é a interação eletrostática entre resíduos de Dab carregados positivamente na polimixina e grupos de fosfato carregados negativamente no lipídio A do LPS. A célula bacteriana é capaz de reduzir a atração eletrostática inicial reduzindo a carga negativa líquida da membrana externa, através de modificações no lipídio A, aumentando assim a resistência à polimixina. O mecanismo de resistência adquirida à polimixina, é atribuído à blindagem de fosfatos em lipídios A com grupos positivamente carregados, como fosfoetanolamina (pEtN) e L-4-aminoarabinose (L-Ara4N), que é mediado por sistemas de dois componentes (TCS- Two component systems) PhoP-PhoQ PmrA-PmrB (YU *et al.*, 2015; FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

2.2.4 SISTEMA DE DOIS COMPONENTES *pmrA-pmrB*

Normalmente a ativação do sistema *pmrA/pmrB* ocorre quando as bactérias experimentam ambientes que contêm alta Fe³⁺ e Al³⁺, ou baixo pH e cAMP, todos detectados pelo sensor PmrB. Em resposta a esses sinais indutores, o PmrB se autofosforila e, em seguida, transfere o grupo fosforila para o seu regulador de resposta cognato PmrA. O PmrA (PmrA-P) é a forma ativa da proteína que se liga ao DNA, promovendo a expressão de genes que compõem os operons *pmrCAB* e *arnBCADTEF* (ou também conhecido como *pmrHFIJKLM*), assim como do gene *pmrE* e *pmrC*, os quais estão diretamente envolvidos na modificação do LPS a partir da adição de 4-aminodeoxi-L-arabinose (LAra4N) e fosfoetanolamina (pEtN) (CHEN E GROISMAN, 2013; ZHOU *et al.*, 2001).

A ativação do sistema PmrA-PmrB também ocorre por via indireta através do baixo Mg²⁺ e ativação do sistema PhoP/PhoQ através de um processo que requer a ativação do *pmrD* ativado pelo PhoP. PmrD é uma proteína básica de 85 aminoácidos, que regula a pós-tradução e a atividade de PmrA ao direcionar o domínio N-terminal de PmrA-P (KATO E GROISMAN, 2004). Consequentemente, o PmrD estabiliza a forma fosforilada de PmrA, protegendo-a da desfosforilação por PmrB. Tal proteção promove o acúmulo de PmrA ativo (ou seja, PmrA-P) e a expressão de genes dependentes de PmrA quando as bactérias experimentam baixos Mg²⁺. Portanto, o PmrD define uma classe de proteínas denominadas, conectores que promovem a ativação de sistemas de dois componentes na ausência de seus sinais cognatos, criando ligações regulatórias entre duas vias independentes de transdução de sinal (KATO E GROISMAN, 2004; CHEN E GROISMAN, 2013).

A resistência à polimixina é controlada principalmente pelo sistema regulatório PmrA/PmrB. Uma cepa resistente à polimixina que expressa uma proteína PmrA constitutivamente exibe níveis aumentados de pEtN e LAra4N no lipídio A na porção do LPS, sugerindo que essas modificações controladas por esse TCS são necessárias para a resistência à polimixina. Mutações específicas nos genes PmrA e PmrB foram descritas como sendo responsáveis pela resistência adquirida à colistina em isolados de *K. pneumoniae* (LEE *et al.*, 2004; OLAITAN *et al.*, 2014).

2.2.5 SISTEMA DE DOIS COMPONENTES *phoP-phoQ*

A ativação do sistema PhoP-PhoQ ocorre quando as bactérias experimentam ambientes com baixa de Mg^{2+} , cAMP, e baixo pH, ou no caso de resistência mediada pelo polimixina, é dado por mutações específicas nesse TCS. A proteína sensor histidina quinase PhoQ, percebe estímulos ambientais, sofrendo uma reação de autofosforilação, ativando uma segunda proteína citoplasmática PhoP, por uma reação de transfosforilação. Então PhoP ativa a expressão de *PmrHFIJKLM*, diretamente pela ligação ao promotor *pmrHFIJKLM* e indiretamente via dependente de PmrD ativando assim a proteína PmrA, que também se liga ao promotor *pmrHFIJKLM*. O operon *pmrHFIJKLM* codifica enzimas responsáveis pela síntese e transferência de 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (Lara4N). A adição deste produto catiônico (Lara4N) para lipídio A leva à resistência a polimixinas por modificação do alvo de lipopolissacarídeo (VELKOV *et al.*, 2013; NIKAIDO, 2003; GIRARDELLO; GALES, 2012; POIREL *et al.*, 2015).

2.2.6 OPERON *pmrCAB*

O operon *pmrCAB* codifica três proteínas, nomeadamente, a fosfoetanolamina (pEtN) fosfotransferase PmrC (codificada pelo gene *pmrC*), o regulador de resposta PmrA e a proteína sensora quinase PmrB. A fosfoetanolamina fosfotransferase PmrC, adiciona o grupo pEtN ao LPS da célula bacteriana (Gunn, 2008).

2.2.7 OPERON *pmrHFIJKLM* E O GENE *pmrE*

O operon *pmrHFIJKLM* (também denominado de *arnBCADTEF* ou operon *pbgPE*) codifica um total de sete proteínas. O gene *pmrE* e o operon *pmrHFIJKLM*, são responsáveis pela síntese do grupo L-aminoarabinose (Lara4N) a partir de ácido uridina difosfato glucurônico, fixando-o ao lipídeo A (Yan *et al.*, 2007).

2.2.8 GENE *mgrB*

MgrB é uma pequena proteína transmembrana regulatória cuja produção é induzida após a ativação do sistema de sinalização PhoQ/PhoP e que exerce um feedback negativo sobre o mesmo por interação direta com a proteína sensor quinase PhoQ. A mutação/inativação do gene *mgrB* leva à regulação do sistema PhoQ/PhoP e superexpressão do operon *pmrHFIJKLM* através de uma cascata de sinalização de PhoPQ, PmrD e PmrAB, sendo um mecanismo genético responsável pelo surgimento da resistência à colistina em isolados de *K. pneumoniae* (CANNATELLI *et al.*, 2013; CHENG *et al.*, 2015).

A inativação do MgrB se dá por diversas sequências de inserção (IS5-like, IS1F, ISKpn13, IS903B, ISKpn14, IS10R), pertencentes a várias famílias e inseridas em locais

diferentes dentro do gene *mgrB*. Alterações adicionais relatadas no *MGRB* incluem uma mutação sem sentido que leva ao término prematuro da proteína e mutações missenses resultando em substituições de aminoácidos. Além disso, uma pequena exclusão ou a exclusão completa do locus *mgrB* foi relatada em várias cepas resistentes à colistina (CANNATELLI *et al.*, 2014; OLAITAN *et al.*, 2014).

2.2.9 SISTEMA DE DOIS COMPONENTES *crrA-crrB*

Em um estudo feito por Cheng *et al.*, 2016, observou-se que alguns isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à colistina, não apresentaram mutações em *mgrB*, *phoPQ* ou *pmrAB* (reguladores conhecidos do *pmrHFIJKLM*), porém se mantinham com o fenótipo de resistência, e o gene *pmrH* expresso. Esses dados davam a entender que existiria um novo mecanismo que implicaria na resistência a polimixina nesses isolados, o TCS *crrAB*. O operon *crrAB* foi recentemente descrito, e a análise filogenética mostrou que este operon estão presentes quase que exclusivamente em algumas cepas de *Klebsiella pneumoniae* e evidências sugerem que foi adquirido por transferência horizontal de genes (por isso pode não estar presente em alguns isolados)(WRIGHT *et al.*, 2015).

CrrB é uma proteína sensor histidina quinase e *CrrA* é um regulador de resposta adjacente. Ao redor do locus *crrAB* são encontrados, na orientação oposta, o gene *H239_3059* e um operon composto por quatro genes, *CRRC*, *H239_3063*, *H239_3064* e *H239_3065*. *H239_3059* que codifica uma glicosiltransferase. A mutação ou inativação do gene *crrB* é responsável pela regulação da expressão de um conjunto de genes: *crrAB*, *CRRC*, *H239_3059*, *H239_3063*, *H239_3064*, *H239_3065*, *pmrAB*, *pmrHFIJK*, *pagPe* e *phoPQ*. Esses mutantes exibem modificações na porção do lipídio A com incorporação de LAra4N e palmitoilação, resultando em um nível de resistência a colistina extremamente alto (MIC > 512 µg/ml). Estudos anteriores hipotetizaram que as mutações de *CrrB* aumentam a transcrição do gene *crrC*, o que, por sua vez, regula a expressão dos genes *pmrC* e *pmrE* e do operon *pmrHFIJKLM*, através da superexpressão do sistema de dois componentes *pmrAB*, induzindo assim a resistência a colistina através da modificação do LPS, figura 5. (PANTEL *et al.*, 2021; WRIGHT *et al.*, 2015; CHENG *et al.*, 2016).

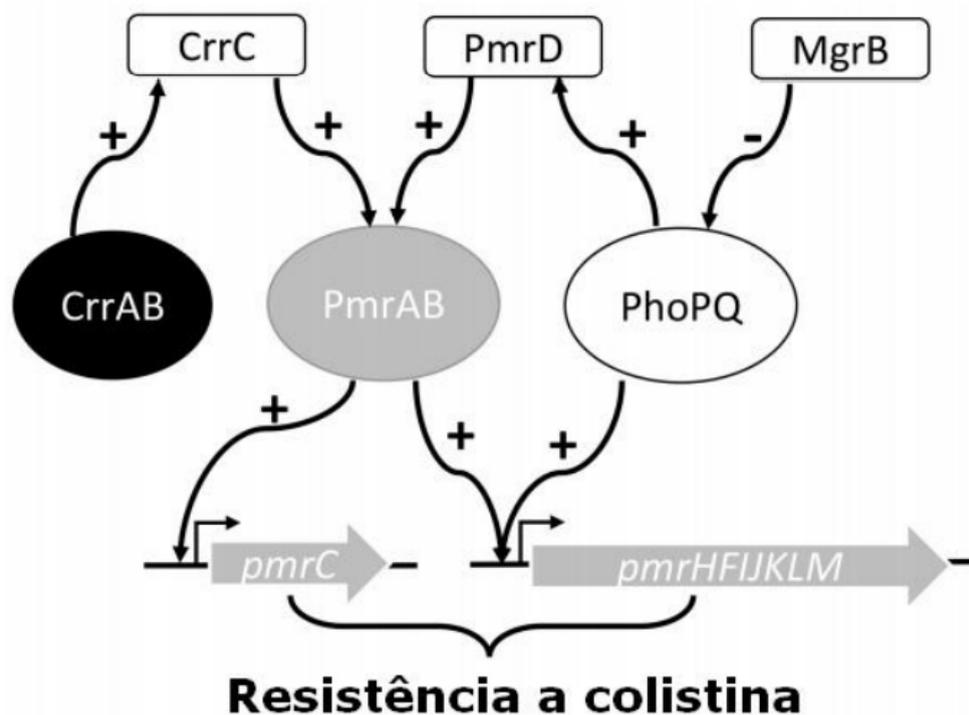


Figura 5. Os sistemas CrrAB, PmrAB e PhoPQ induzem a expressão de *pmrC* e *pmrHFIJKLM*, que geram mudanças no LPS. Esses sistemas são regulados por MgrB, CrrC e PmrD. MgrB faz a regulação negativa, enquanto que CrrC e PmrD fazem regulação positiva. Mutações ou interrupções nesses componentes podem levar a uma regulação anormal, resultando em um aumento da modificação do LPS associada ao operon *pmrHFIJKLM* e *pmrC*. Fonte: CHENG *et al.*, 2016.

2.3.0 GENE *mcr*

Além dos mecanismos acima descritos, em novembro de 2015, Liu e colaboradores relataram o primeiro mecanismo de resistência plasmidial frente às polimixinas, 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 bacilos gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos (LIU *et al.*, 2016, TANISE, 2018). Esse gene é responsável por codificar a proteína MCR-1, que é membro de uma família de enzimas fosfoetanolamina-transferases, onde a sua expressão em *E. coli* resulta na adição de fosfoetanolamina (PEtN) ao lipídeo A. Esse gene foi encontrado em isolados *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas de carnes de animais, comida e pacientes na China (LIU *et al.*, 2015). Neste momento, nove genes *mcr* foram descritos; mas, *mcr-1* é, de longe, o mais prevalente. O *McR-1* foi descrito em quase todos os países da região das Américas, enquanto os genes *MCR-3* e *MCR-5* foram descritos esporadicamente apenas no

Brasil e na Colômbia, respectivamente. Independentemente das espécies, o *MCR-1* foi associado a um fragmento de DNA de ~2609 bp contendo os genes *mcr-1* e *pap2*, e foi mobilizado em um transposon composto o *ISApII* e em diferentes replicons de plasmídeos, dos quais IncI2, IncX4 e IncHI2 são os grupos de incompatibilidade mais comuns descritos até agora (FACCONE *et al.*, 2020; MATAMOROS *et al.*, 2017; QUAN *et al.*, 2017).

2.3.1 CÁPSULA POLISSACARÍDICA (CPS) ASSOCIADA A RESISTÊNCIA A POLIMIXINA

O polissacarídeo capsular (CPS) pode estar relacionado à resistência à polimixina em *K. pneumoniae*. Mosa *et al.*, 2015 hipotetizou que a inativação do gene *mgrB* produz uma cápsula de multicamadas que faz não permitir que a colistina penetre na parede celular para atingir seu alvo LPS, o que pode estar implicado no fenótipo resistente à colistina. Em outro estudo, Campos *et al.*, 2004 encontrou uma correlação entre a quantidade de CPS expressa por *K. pneumoniae* e resistência a polimixina B. Eles também relataram que *K. pneumoniae* aumentou a quantidade de CPS quando cultivada na presença de polimixina B. Conseqüentemente, foi descrito que esta superprodução de CPS poderia ser devido à liberação de CPS como um traço cv de virulência para aprisionar peptídeos antimicrobianos, como polimixina B e neutrófilos humanos α -defensina, que por sua vez irá proteger as bactérias, reduzindo o quantidade de peptídeos atingindo a superfície bacteriana.

3.0 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA À POLIMIXINA EM *Klebsiella pneumoniae*

O programa de vigilância antimicrobiana SENTRY realizou uma pesquisa mundial em 2009 e relatou baixas taxas de resistência a polimixina entre patógenos Gram-negativos (*Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, *E. coli*, e *Klebsiella* spp.) (<0,1% para 1,5%). No entanto, observou-se tendência de aumento em um período de estudo de 2006-2009 com foco em isolados de *K. pneumoniae* (taxas de resistência de 1,2% em 2006 e 1,8% em 2009), provavelmente devido ao uso extensivo e/ou inadequado de polimixinas em todo o mundo para o tratamento de infecções com bactérias MDR Gram-negativas (POIREL *et al.*, 2017).

A resistência à colistina em *K. pneumoniae* representa uma crescente preocupação com a saúde pública, uma vez que esta espécie bacteriana é um dos principais patógenos da infecção nosocomial e reuniu uma ampla gama de mecanismos de resistência a antibióticos de amplo espectro ao longo dos anos. A ocorrência de resistência à colistina em *K. pneumoniae* tem sido relatada em estudos de vigilância e relatos de casos clínicos em todo o mundo (GALES *et al.*, 2011; POIREL *et al.*, 2017). Vários surtos com isolados resistentes a carbapenem e colistina foram relatados na América do Norte e Europa.

Pesquisas multicêntricas mostraram baixas taxas de resistência à colistina em *k. pneumoniae* em isolados no Canadá (2,9%) e nos Estados Unidos (4%). No entanto, a taxa de

resistência à colistina foi maior (6,7 a 18%) entre os isolados produtores de carbapenemase. Além disso, surtos com *K. pneumoniae*, resistente à colistina, produtoras de KPC, foi sugerido ser endêmico no Brasil e nos EUA segundo Bartolleti *et al.*, 2016, atribuídos principalmente ao tipo de clone epidêmico internacional ST258. Uma quantidade significativa de KPC também foi relatada na Argentina, seguida por Colômbia, México e Chile. O resto vem de relatórios com isolados em Cuba, Peru, Paraguai, Uruguai e Equador. Nenhum caso foi relatado de outros países nas Américas (WALKTY *et al.*, 2008; SUTHERLAN E NICOLAU, 2015; POIREL *et al.*, 2017; RODRÍGUEZ *et al.*, 2021).

Segundo Rodríguez *et al.*, 2021, 95,3% das Enterobactérias produtores de carbapenemase e resistentes à colistina nas Américas são *K. pneumoniae*, e os 4,7% restantes estão distribuídas entre *E. coli*, *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp*. e *Citrobacter spp*. A carbapenemase do tipo KPC, foi identificada em 88,7% de todos os isolados de *K. pneumoniae*, enquanto a segunda mais frequente foi a NDM-1 com 2,6%; além disso, alguns isolados foram positivos para o grupo OXA-48 (OXA-48, OXA-232 e OXA-370), e apenas 1 isolado carregava a carbapenemase BKC-1 (MARTINS *et al.*, 2016; RODRÍGUEZ *et al.*, 2021).

Desde a primeira descrição do gene *mcr-1* na China, vários estudos de vigilância conduzidos em todo o mundo relataram a identificação de Enterobactérias produtoras de MCR-1 de fontes diversas, incluindo principalmente animais usados para alimentação de humanos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2021). Embora a grande maioria desses relatórios esteja concentrada na Europa e na Ásia (ELBEDIWI *et al.*, 2019). Os isolados portadores do gene *mcr-1* foram relatados em pessoas com histórico de viagens ao México, Colômbia, Peru, Bolívia e República Dominicana. MCR-1- foi notificado em cepas de *E. coli* em carne de frango importada do Brasil (CHIBA *et al.*, 2019). Essas descobertas sugerem que a América Latina e o Caribe pode ser reservatório para a disseminação da gene *mcr-1*. Da mesma forma, especula-se que esses isolados produtores deste gene foram subnotificados na América do Sul porque a susceptibilidade às polimixinas não é testada rotineiramente e, em muitos casos este teste é reservado para isolados resistentes a carbapenem. Além disso, isolados positivos para *mcr-1* sensíveis à polimixina (MIC $\leq 2 \mu\text{g} / \text{mL}$) foram identificados e podem permanecer não detectados (ROSSI *et al.*, 2017; RODRÍGUEZ *et al.*, 2021). As ESBLs mais freqüentemente relatadas em isolados produtores de MCR são enzimas do tipo CTX-M, com maior percentual; e Carbapenemases do tipo KPC, NDM e SHV também. e o plasmídeo InX4 era o portador de *mcr-1* em 48 isolados incluindo *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. enterica* (GARZA *et al.*, 2018; RODRÍGUEZ *et al.*, 2021).

Na Europa, dois surtos atribuídos aos clones ST258 e ao ST512 foram relatados na Itália, com bactérias de *K. pneumoniae* resistentes à colistina e produtor de KPC. O que tornou-se extremamente preocupante, pois a resistência à colistina foi recentemente relatada em alto nível (>20%) entre os isolados produtores de carbapenemase em UTIs de dois hospitais italianos, com uma taxa ainda maior (36,1%) em hospitais em Roma (POIREL *et al.*, 2017).

Na Grécia, vários surtos causados por isolados *K. pneumoniae*, produtores de KPC, resistentes à colistina foram relatados (ANTONIADOU *et al.*, 2007). Estudos realizados em

dois hospitais gregos relataram um enorme aumento na resistência à colistina em poucos anos (< 3,5% de incidência antes de 2010 e >20% de incidência após 2010) (MELETIS et al., 2015). Durante um período de 2 anos (2010 a 2012) na Espanha, um estudo mostrou um aumento da prevalência de resistência à colistina entre os isolados *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase, de 13,5 para 31,7% (PENA E PICAZO, 2014; MELETIS et al., 2015; POIREL et al., 2017).

Na Ásia taxas moderadas de resistência à colistina (cerca de 6 a 11%) foram relatadas para isolados de *K. pneumoniae* na Coreia do Sul e Cingapura, e taxas de resistência semelhantes (4,4 a 12,1%) foram encontradas entre isolados produtores de KPC em China e Taiwan. Isolados de *K. pneumoniae* resistentes à colistina também foram relatados no Laos e na Tailândia (POIREL et al., 2017).

Um estudo realizado com isolados de *K. pneumoniae* panresistentes oriundos de hospitais de Dubai co-produtores de OXA-48 e NDM-1, confirmaram altas taxas de resistência à colistina com 31,4%, em uma amostra de setenta e sete isolados produziram carbapenemase em: 53,3% semelhante a OXA-48, 24,7% NDM e 22,1%, e apresentaram diversidade clonal dessas cepas, as quais pertenciam ao ST14, ST15 e ST231 (Moubareck et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Realizar a análise genética dos sistemas de dois componentes envolvidos na resistência a polimixina em isolados de *Klebsiella pneumoniae*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a relação clonal entre os isolados de *K. pneumoniae* resistentes às polimixinas;
- Identificar mutações nas sequências dos genes que compõem os sistemas de dois componentes dos isolados do estudo;
- Investigar os efeitos das mutações identificadas e a possível relação com a resistência à polimixina.

4. METODOLOGIA

4.1 LINHAGENS BACTERIANAS

Foram incluídas no estudo 16 amostras de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina (denominadas de Pol-1 a Pol-21), as quais foram coletadas no período compreendido entre setembro de 2013 a março de 2016 pelo laboratório de bacteriologia de um Hospital Universitário, que presta serviços à Universidade de Pernambuco, Recife. Os isolados permaneceram conservados em estoque congelado (-80°C), na presença de polimixina e em glicerol a 15% até o dia de uso.

4.2 ANÁLISE DA CLONALIDADE

A relação clonal entre os isolados foi realizada a partir da investigação de sequências palindrômicas extragênicas repetidas (REP). A reação foi realizada com os primers (5'-IIIGCGCCGICATCAGGC-3' e 5'-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3') e condições descritas por Villa et al., 1996.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO

O DNA utilizado nas análises moleculares foi obtido a partir do método de lise osmótica. Com suspensões bacterianas constituídas de colônias frescas (crescidas por 16-18 horas em ágar Mueller Hinton) inoculadas em 300µL de água ultrapura livre de nuclease, homogeneizadas com o auxílio de um agitador de tubos vórtex (Vision Scientific). O DNA genômico de todas as cepas também foi obtido a partir de reagente Brazol® segundo recomendações do fabricante.

4.4 AMPLIFICAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA

Reações em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizadas para amplificar os genes que compõem os principais sistemas de dois componentes de *K. pneumoniae*: *pmrAB*, *phoPQ* e *crrAB*, utilizando condições de ciclagem e oligonucleotídeos iniciadores seguindo o protocolo disponível em Jayol et al. (2014), e por Zeinab et al (2019).

4.5 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR

A purificação dos produtos obtidos a partir das PCRs realizadas ao longo do estudo foram realizadas utilizando a mistura de Fenol e Clorofórmio. Para isto, foram adicionados 40µL de água dEPC (água livre de nucleasse) a 10µL do produto de PCR. O sistema foi homogeneizado e logo após 50µL de Fenol-Clorofórmico, na proporção de 1:1 foi adicionado ao sistema, que foi homogeneizado brandamente e centrifugado por 5 minutos a 4°C a 10.000rpm. Cerca de 35µL obtidos do sobrenadante foi precipitado em novos tubos contendo 70µL e 64µL de etanol 100% e isopropanol absoluto, respectivamente. Os tubos foram homogeneizados gentilmente e mantidos a -20°C por 18-20 horas. Após este período, os tubos foram novamente homogeneizados e centrifugados por 15 minutos a 4°C a 12.000rpm. Logo após, o sobrenadante foi desprezado e lavado com aproximadamente 100µL de etanol gelado a 75%. Novamente o sistema foi centrifugado por 5 minutos a 12.000rpm, e o sobrenadante foi desprezado. Os tubos serão deixados invertidos em repouso, até a evaporação completa do etanol. Por fim, o DNA purificado foi ressuspenso em 10µL de água dEPC e enviado ao sequenciamento, cumprindo todas as recomendações da Plataforma de Sequenciamento do Centro de Biociências da UFPE. Os experimentos foram repetidos de duas a três vezes para confirmação dos resultados.

4.6 ANÁLISES *in silico* DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

As análises das sequências nucleotídicas dos genes *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, e *phoQ*, foram feitas no software *Bioedit Sequence Alignment Editor v7*. A amostra recebida da plataforma de sequenciamento é fornecida por pares de cromatogramas de cada isolado, cada um representa as sequências de DNA geradas a partir de uma extremidade diferente da molécula utilizando os pares de primers F e R (forward e reverse). A inspeção do cromatograma é feita em toda sua extensão das fitas F e R, para correções de bases indefinidas por erros do sequenciador. Em seguida é criada uma sequência consenso das duas fitas, representando a sequência inteira da molécula obtida a partir da junção de ambas. Para identificação de mutações assim como a ocorrência de alterações a níveis de aminoácido e proteína, foram feitos alinhamentos múltiplos incluindo todas as fitas consenso e a sequência da cepa

referência sensível a colistina MGH 78578 disponível no GenBank (código de acesso: CP 000647.1).

4.7 FERRAMENTA SMART E PROVEAN

Para esclarecer melhor os domínios proteicos estruturais contidos nos genes, o site SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (<http://smart.embl-heidelberg.de>) foi utilizado para analisar a arquitetura dos domínios e funções destes, dos genes *pmrAB* e *phoPQ*. E a ferramenta Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN) (<http://provean.jcvi.org/index.php>) foi utilizada para as análises das variações na sequências de aminoácidos, classificando-as em neutras ou deletérias quanto ao efeito ocasionado no funcionamento da proteína.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES *phoPQ* e *pmrAB*.

O contexto genético dos genes que compõem o sistemas de dois componentes responsáveis pelas modificações químicas do LPS e expressão de resistência a polimixina em *Klebsiella pneumoniae* (*phoPQ* e *pmrAB*) foi investigado, revelando a presença de varias mutações na cadeia nucleotídica onde algumas alteraram a cadeia de aminoácidos. Os resultados estão compilados em anexos Tabela 1-4. Ao avaliar a sequência nucleotídica do gene da *pmrA* de região codificante de 672pb dos dezesseis isolados, foi observada uma mudança de uma guanina por adenina na posição 42 (G42A) nos Pol6, Pol7, Pol11, Pol14, e Pol15 e classificada como silenciosa (Onde ocorre uma mudança de uma das bases do DNA o que leva o tripleto de nucleótidos a ficar diferente da sequência normal, embora acabe por codificar o mesmo aminoácido). Nos demais isolados, o gene encontra-se conservado, compartilhando 100% de identidade com a sequência da cepa referência.

O gene *pmrB* que apresenta uma região codificante de 1098pb destacou-se pelo elevado número de alterações. Em todos os isolados a mutação (A736G) foi prevalente seguida da mutação (G663C) classificadas como *missense* e silenciosa, respectivamente. Observou-se a inserção de uma citosina entre as posições 166 e 167 (Cins166_167) em cinco dos isolados, esta mutação mudou a matriz de leitura da sequência de aminoácidos levando a adição de códon de parada prematuro, resultando em uma proteína truncada de 61aa caracterizando uma mutação do tipo *frameshift*. Outras mutações do tipo *nonsense* também foram identificadas, neste tipo de mutação há alteração de uma das bases do DNA, de tal forma que o tripleto de nucleótidos do qual ela faz parte se altera, passando a codificar um códon de terminação. Ou seja, a proteína nascente é truncada prematuramente. As principais mutações que acarretam mudanças na funcionalidade protéica aconteceram entre os domínios HATPase_c e no início da sequência da segunda região transmembrana conforme a ferramenta SMART, figura 6.

No gene *phoP* (672pb) em todos os isolados foram observadas duas mutações prevalentes, uma transição de timina para citosina na posição 207 (T207C) e timina por citosina na posição 465 (T465C) estas e outras alterações presentes como identificadas na tabela 3 não ocasionaram nenhuma alteração na cadeia de aminoácidos e foram classificadas como silenciosas.

O gene *phoQ* possui uma região codificante de 1467pb, a maioria de suas mutações segundo a ferramenta PROVEAN foram consideradas deletérias, várias inserções foram identificadas e todas elas levaram mudanças da matriz de leitura e interrupção da proteína (*Stop40Leu*, *Stop221His*, *Stop265Leu*, *Stop345Ala*, *Stop77Tre*) conforme a tabela 4. A mudança de aminoácido de glicina para valina na posição 3 (G3V), e glicina por arginina posição 3 (G3R), nos Pol7, Pol10 e Pol15, teve efeito neutro, classificado como *missense*. De acordo com o SMART, a alteração na Pol1 (L30Q) ocorreu em uma das regiões transmembrana da proteína (figura 7).

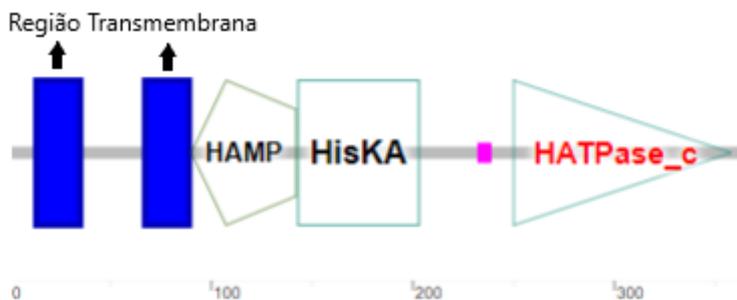


Figura 6. Domínios destacados da proteína PmrB com cinco regiões com funções bioquímicas determinadas, conforme ferramenta SMART.

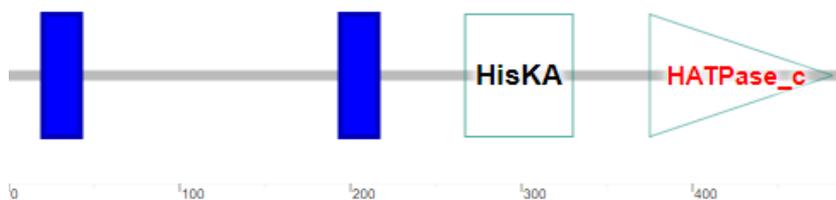


Figura 7. Domínios destacados da proteína PhoQ com quatro regiões com funções bioquímicas determinadas, os retângulos em azul representam as regiões transmembranas, conforme a ferramenta SMART.

5.2 RELAÇÃO CLONAL ENTRE OS 16 ISOLADOS

A partir da REP-PCR foi possível estabelecer a relação clonal preditiva entre os isolados incluídos no estudo. O padrão de bandas exibidos por cada cepa foi comparado e os isolados foram considerados similares ou indistinguíveis entre si segundo os critérios interpretativos de Tenover e colaboradores (1995) (Figura 8). Os isolados Pol1, Pol2, Pol3, Pol4, Pol10, Pol16, Pol17 apresentaram a mesma quantidade de bandas. Os demais não variaram significativamente, apresentando de 2 a 5 bandas não compartilhadas com o grupo prevalente, a figura 8 indica por cor o agrupamento de todos os isolados, no total é possível ver quatro grupos e estes indicam um padrão de similaridade entre todos os isolados.

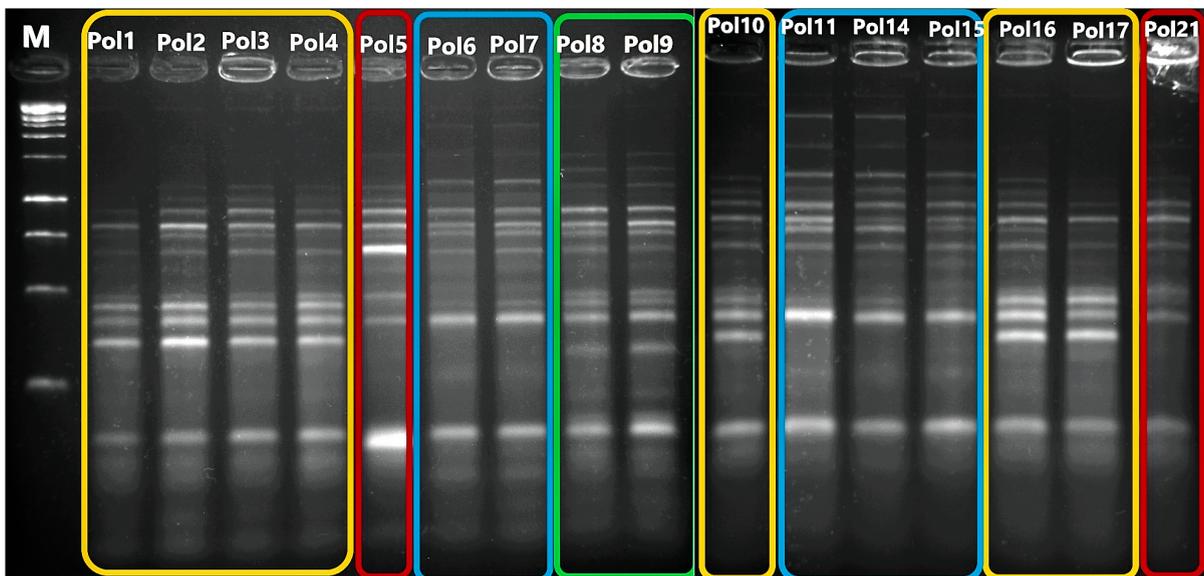


Figura 8. Gel de eletroforese com produto da REP-PCR. M- marcador molecular de 100pb, Pol1-Pol21 perfil de REP-PCR dos isolados bacterianos de *K. pneumoniae*.

6. DISCUSSÃO

K. pneumoniae tem se demonstrado como um dos principais patógenos detectados em unidades hospitalares pela colonização ou infecção de pacientes, em diversos sítios, como: trato urinário, corrente sanguínea, trato respiratório inferior, sistema gastrointestinal (SANTOS, 2011). Desde que descobriu as carbapenemases, principalmente do tipo KPC, houve consideravelmente o aumento no uso das polimixinas. A exposição prévia às polimixinas até mesmo em baixas doses, bem como a sua utilização indiscriminada, são os principais fatores que permitem o desenvolvimento de resistência a esse grupo de fármacos. Conforme a literatura consultada, o mecanismo de resistência mediada pelos sistemas regulatórios de dois componentes PmrA-PmrB e PhoP-PhoQ tem papel imprescindível para falta de susceptibilidade desse fármaco.

A maior frequência de alterações que ocasionam modificações na proteína, foram observadas em PmrB, as mutação (Arg256Gly e Tre246Ala) prevalente em nosso estudo, também foram identificadas por outros autores. Em Cheng et al, 2015, mostrou que a alteração de A256G, após ensaios de clonagem, não altera as CIMs para polimixina. Pitt e colaboradores (2018) também detectaram em isolados de *K. pneumoniae* susceptíveis a polimixina. Em outro estudo feito por Longo et al, 2019 as duas mutações foram prevalentes, porém sem descrição de alterações do MICs. Dessa forma, sugere-se que tais mutações não são determinantes para a resistência a este antimicrobiano. Devido a isso, as alterações encontradas nos demais genes, bem como mecanismos não investigados neste estudo, podem apresentar maior impacto na mediação da resistência às polimixinas nos isolados analisados

A mutação no aminoácido identificada no gene *phoQ* na posição 30 ocorreu em uma das regiões transmembrana da proteína, Cheng et al, 2015, relatou que substituições localizadas nesse domínio transmembranar, podem influenciar a conformação da proteína ou a estabilidade do oligômero, afetando a atividade de *phoQ* de tirosina quinase, transferência de fosfato e fosfatase. Consequentemente, essa mutação deve promover a superexpressão dos genes alvo regulados pelo TCS PhoPQ e o desenvolvimento de resistência a polimixina, como já foi publicado em outros trabalhos, associando mutações diferentes da relatada no nosso estudo, porém ocorrendo no mesmo domínio proteico.

Outras mutações não descritas anteriormente por outros estudos foram encontradas em *pmrB* e *phoQ* (*Stop61Ala*, *E7K*, *Stop345Ala*, *Stop221His*, *Stop40Leu*, *Stop265Leu*, *G3R*, *G3V*, *Stop77Tre*) contudo estas alterações estão fora dos domínios protéicos apresentados pela ferramenta SMART, onde não é possível distinguir inicialmente sua função, supostamente a perda dessa proteína pode representar danos celulares significativos, visto que o sistema PhoPQ e PmrAB, atua globalmente na regulação na expressão gênica.

Essas descobertas destacam o amplo espectro de modificações cromossômicas que podem facilitar e regular a resistência às polimixinas em *K. pneumoniae*. O estudo fornece um relatório potencial de mutações supressoras de resistência à polimixina. Porém, ainda se faz necessário outros estudos dos efeitos biológicos que as alterações nos TCSs trazem para a

expressão dos genes alvo regulados pelos mesmos, visando a obtenção da completa elucidação a respeito do funcionamento desses mecanismos de resistência às polimixinas.

7. CONCLUSÃO

Mutações pontuais atribuídas à resistência à polimixina foram identificadas em alguns isolados, mas a contribuição de outros genes merece uma investigação mais aprofundada, visto que há contribuições de outros genes conectores que também promovem a ativação de sistemas de dois componentes.

8. ANEXOS

Tabela 1. Análise *in silico* gene *pmrA* região codificante de 672pb.

Isolados	Gene	Mutação no nt	Mutação no aa	Tipo de mutação
Pol1		-	-	-
Pol2		-	-	-
Pol3		-	-	-
Pol4		-	-	-
Pol5		-	-	-
Pol6		G42A	-	Silenciosa
Pol7		G42A	-	Silenciosa
Pol8	<i>pmrA</i> *	-	-	-
Pol9		-	-	-
Pol10		-	-	-
Pol11		G42A	-	Silenciosa
Pol14		G42A	-	Silenciosa
Pol15		G42A	-	Silenciosa
Pol16		-	-	-
Pol17		-	-	-
Pol21		-	-	-

*Análises comparativas utilizando a cepa MGH 78578 (672pb/ 223aa)

Tabela 2. Análise *in silico* gene *pmrB* região codificante de 1098pb.

Isolados	Gene	Mutação no nt	Mutação no aa	Tipo de mutação
Pol1		C663G/ A736G/ C766G/ A846G/ Gins959_960/ Gins1000_1001/ A1082T	T246A/ R256G	<i>Missense/ Frameshift</i>
Pol2		<i>Cins166_167/ C663G/ A736G/ C766G/ A846G/ Gins879_880/ ΔG882/ G1056T/ G1076A</i>	<i>Stop61Ala</i>	<i>Frameshift/ Nonsense</i>
Pol3		C663G/ <i>Cins166_167/ A736G/ C766G/ A846G/ Gins879_880</i>	<i>Stop61Ala</i>	<i>Frameshift/ Nonsense</i>
Pol4		C663G/ <i>Cins166_167/ A736G/ C766G/ A846G/ Ains879_880</i>	<i>Stop61Ala</i>	<i>Frameshift/ Nonsense</i>
Pol5		C663G/ A736G/ C766G/ A846G	T246A/ R256G	<i>Missense</i>
Pol6		A736G	T246A	<i>Missense</i>
Pol7		A736G	T246A	<i>Missense</i>

Pol8	<i>pmrB</i> *	C663G/ A736G/ C766G/ A846G	T246A/ R256G	<i>Missense</i>
Pol9		C663G/ A736G/ C766G/ A846G	T246A/ R256G	<i>Missense</i>
Pol10		<i>Cins166_167/ C663G/ A736G/ C766G/ A846G/</i>	<i>Stop61Ala</i>	<i>Frameshift/ Nonsense</i>
Pol11		A736G/ G846A	T246A	<i>Missense</i>
Pol14		A736G	T246A	<i>Missense</i>
Pol15		A736G	T246A	<i>Missense</i>
Pol16		C663G/ A736G/ C766G/ A846G	T246A/ R256G	<i>Missense</i>
Pol17		G19A/ <i>Cins166_167/G663C/ A736G/ C766G/ Gins879_880/ ΔG882</i>	E7K/ <i>Stop61Ala</i>	<i>Missense/ Frameshift/ Nonsense</i>
Pol21		<i>Cins166_167/ A469C/ Cins564_565/ G663C/ A736G/ C766G/ Ains879_880</i>	<i>Stop61Ala</i>	<i>Frameshift/ Nonsense</i>

*Análises comparativas utilizando a cepa MGH 78578 (1098pb/ 365aa).

Legenda: ΔDeleção, G- Glicina, R- Arginina, A – Alanina, E – Glutamato, K – Lisina, T- Treonina Alanina,

Obs: As mutações não especificadas foram do tipo silenciosas.

Tabela 3. Análise *in silico* gene *phoP* região codificante de 672pb.

Isolados	Gene	Mutação no nt	Mutação no aa	Tipo de mutação
Pol1		T207C/ T465C	-	Silenciosas
Pol2		T207C/ T465C	-	Silenciosas
Pol3		T207C/ T465C	-	Silenciosas
Pol4		T207C/ T465C	-	Silenciosas
Pol5		T207C/ T465C	-	Silenciosas
Pol6		T207C/ T363C/T465C/T664C	-	Silenciosas
Pol7		T207C/ T363C/T465C/T664C	-	Silenciosas
Pol8	<i>phoP</i> *	T207C/ T465C	-	Silenciosas
Pol9		T207C/T465C	-	Silenciosas
Pol10		T207C/ T465C	-	Silenciosas
Pol11		T207C/ T363C/ T465C/ T664C	-	Silenciosas
Pol14		T207C/T363C/T465C/T664C	-	Silenciosas
Pol15		T207C/ T363C/ T465C/ T664C	-	Silenciosas/
Pol16		T207C/ T465C	-	Silenciosas
Pol17		<i>Gins22_23/Ains33_34/T207C/ T465C</i>	-	-
Pol21		T207C/ T465C	-	Silenciosas

*Análises comparativas utilizando a cepa MGH78578

Tabela 4. Análise *in silico* gene *phoQ* região codificante de 1467pb.

Isolados	Gene	Mutação no nt	Mutação no aa	Tipo de mutação
Pol-1		C81G/ T89A/ C309A/ T1185C	L30Q	Missense
Pol-2		Δ A5/ G43C/ Cins43_44/ C81G/ C309A/ Gins925_926/ T1185C	Stop345Ala	Frameshift/ Nonsense
Pol-3		C81G/ C309A/ Tins543_544/ G886A/ Gins925_926/ T1185C	Stop221His	Frameshift/ Nonsense
Pol-4		Tins5_6/G6A/C81G/C309A/Cins555_556/T626 C/ G627T/ Tins744_745/T1185C	Stop40Leu/Stop221 His/Stop265Leu	Frameshift/ Nonsense
Pol-5		C81/ C309A/ Tins569_570/ Tins722_723/ Cins729_730/ Gins747_748/ Ains811_812/ Tins848_849/ T1185G/ T1434G	Stop221His	Frameshift/ Nonsense
Pol-6		C81G/ C219T/ C309A	-	Silenciosas
Pol-7		G7A/C81G/ C219T/C309A/Tins504_505/	G3R/Stop221His	Missense/ Nonsense
Pol-8	<i>phoQ</i> *	C81G/C309A/T1185C	-	Silenciosas
Pol-9		A5G/C81G/C309A/T1185C	-	Silenciosas
Pol-10		G8T/C81G/C309A/T1185C	G3V	Missense
Pol-11		C81G/C219T/ /C309A/T1185C	-	Silenciosas
Pol-14		C81G/ C219T/ C309A/ Δ T957/ Tins958_959	Stop345Ala	Frameshift/ Nonsense
Pol-15		A5G/G8T/C81G/C219T/C309A/Cins914_915/ T1185C	G3V/Stop345Ala	Missense/ Frameshift
Pol-16		Δ G8/C81G/C309A/T1185C	Stop77Tre	Frameshift
Pol-17		C81G/ C309A/T1185C	-	Silenciosa
Pol-21		C81G/ Tins958_959/ T1185C	Stop345Ala	Frameshift/ Nonsense

*Análises comparativas utilizando a cepa MGH78578 (1467pb/ 488aa).

Legenda: Δ Deleção, L – Leucina, Q – Glutamina, Ala- alanina, His- histidina, Leu-leucina, G-glicina, V-valina, R- Arginina, Treo- treonina

9. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM EP and CHAIM E (1940) An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. **Nature**. 146:837.
- AGUIAR P, ARMOND L.C, PEREIRA P. S, GOMIDES L.F. Os riscos da Klebsiella pneumoniae em ambientes hospitalares. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**. Vol.32,n.1,pp.33-40 (Set – Nov 2020).
- AMBLER RP, COULSON AF, FRERE JM, GHUYSEN JM, JORIS B, FORSMAN M, LEVESQUE RC, TIRABY G and WALEY SG (1991) A standard numbering scheme for the class a beta-lactamases. **Journal of Biochemistry**. v. 276, p. 269-270, 1991.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2007) Antimicrobianos: Base teórica e uso clínico. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/lactamicos3.htm.
- BARON, S.; HADJADJ, L.; ROLAIN, J.M.; OLAITAN, A.O. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **Int J Antimicrob Agents**. v. 48, p. 583-591, 2016.
- BARTOLLETTI F, SECO BMS, D SANTO CC, FELIPE CB, LEMO MEB, ALVES TDS, et al. Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae, São Paulo, Brazil. **Emerg Infect Dis** 2016;22:1849–51.
- BERGEN P.J. *et al.* Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against Pseudomonas aeruginosa. **Antimicrob agents chemotherapy**, Washington, v. 50, n.6, p.1953-1958, 2005.
- BISWAS, S.; BRUNEL, J.M.; DUBUS, J.C.; REYNAUD-GAUBERT, M.; ROLAIN, J.M. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. v. 10, n. 8, p. 917–934, 2014.
- BUSH K and JACOBY G (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**. 54: 969–76, 2010.
- 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.
- BLAIR JMA, WEBBER MA, BAYLAY AJ, OGBOLU DO and PIDDOCK LJV (2015) *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol**. 13:42–51.
- BONOMO RA (2017) β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 3:a025239.

CAMPOS MA, VARGAS MA, REGUEIRO V, LLOMPART CM, ALBERTÍ S, BENGOCHEA JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infect Immun** 2004;72:7107–14.

CANNATELLI, A.; D'ANDREA, M.M.; GIANI, T.; DI, P.V.; ARENA, F.; AMBRETTI, S.; *et al.* In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertion al inactivation of the PhoQ/PhoP *mgrB* regulator. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 57, p. 5521–5526, 2013.

CATRY B, BAPTISTE K, GRAVE K, GREIN K, HOLM A, JUKES H, *et al.* 2015. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. **Int J Antimicrob Agents**. 46: 297–306.

CHEN HD, GROISMAN EA. The biology of the PmrA/PmrB two-component system: the major regulator of lipopolysaccharide modifications. **Annu Rev Microbiol**. 2013;67:83-112.

CHENG YH, LIN TL, PAN YJ, WANG YP, LIN YT, WANG JT. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. **Antimicrob Agents Chemother**. 2015 May;59(5):2909-13.

CHENG YH, LIN TL, LIN YT, WANG JT. 2016. Amino acid substitutions of CrrB responsible for resistance to colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother** 60:3709–3716.

CHIBA N, TANIMOTO K, HISATSUNE J, SUGAI M, SHIBAYAMA K, WATANABE H, *et al.* Detection of *mcr-1*-mediated colistin resistance in *E. coli* isolate from imported chicken meat from Brazil. **J Glob Antimicrob Resist** 2019;16:249–50.

COOKSEY RC (1998) Mechanisms of resistance to antibacterial agents. **Princip Med Bio**. 9:199- 214.

DELEO FR, CHEN L, PORCELLA SF, MARTENS CA, KOBAYASHI SD, PORTER AR, CHAVDA KD, JACOBS MR, MATHEMA B, OLSEN RJ, *et al.* 2014. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. **Proc Natl Acad Sci** 111: 4988–4993

ELBEDIWI M, Li Y, PAUDYAL N, PAN H, Li X, Xie S, *et al.* Global burden of colistin resistance bacteria: mobilized colistin resistance genes study (1980–2018). **Microorganisms** 2019;7:461.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae**. Stockholm: ECDC; 2016 available in: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1473309915004247>> Acesso em 25 março de 2020.

FACCONE D, RAPOPORT M, ALBORNOZ E, CELAYA F, DE MENDIETA J, DE BELDER D, LUCERO C, GOMEZ S, DANZE D, PASTERAN F, CORSO A;

MOBILIZABLE. Colistin Resistance Group. Plasmidic resistance to colistin mediated by *mcr-1* gene in *Escherichia coli* clinical isolates in Argentina: A retrospective study, 2012-2018. **Rev Panam Salud Publica**. 2020 Sep 23;44:e55.

FALAGAS ME, KASIAKOU SK and SARAVOLATZ LD (2005) Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. **Clin Infect Dis**. 40:1333–1341.

FORMOSA C, HEROLD M, VIDAILLAC C, DUVAL RE, DAGUE E. Unravelling of a mechanism of resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* using atomic force microscopy. **J Antimicrob Chemother** 2015;70:2261–70.

FERNÁNDEZ L, ALVAREZ-ORTEGA C, WIEGAND I, OLIVARES J, KOCÍNCOVÁ D, LAM JS, MARTÍNEZ JL, HANCOCK RE Caracterização do resistome de polimixina B de *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**. 2013 Jan; 57(1):110-9.

GALES AC, JONES RN, SADER HS. 2011. Atividade contemporânea de colistina e polimixina B contra uma coleção mundial de patógenos Gram-negativos: resultados do Programa de Vigilância Antimicrobiana sentry (2006-09). **J Antimicrob Chemother** 66:2070-2074.

GARZA R. U, TAMAYO L. E, *et al*. Draft genome sequence of a multidrug- and colistin-resistance *mcr-1*-producing *Escherichia coli* isolate from a swine farm in Mexico. **Genome Announc** 2018;6 e00102-18.

GIRARDELLO, R.; GALES, A. C. Resistência às Polimixinas : velhos antibióticos , últimas opções terapêuticas. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecções, Santa Cruz do Sul**, v. 2, n. 2, p. 66–69, 2012.

GISKE, C.G.; SUNDSFJORD, A.S.; KAHLMETER, G.; *et al*. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. **J Antimicrob Chemother** . v. 63, n. 1, p. 1–4, 2009.

GIORDANO, C.; *et al*. Expansion of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* with various *mgrB* mutations giving rise to colistin resistance: the role of ISL3 on plasmids. **Int Antimicrob Agents**, v. 51, n. 2, p. 260-265, 2018.

GUNNN JS (2008) The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. **Trends Microbiol**. 16:284 –290.

HOGBERG LD, HEDDINI A and CARS O (2010). The global need for effective antibiotics: Challenges and recent advances. **Trends Pharmacol Sci**. 31, n. 11: 509–515. **Int J Antimicrob Agents**. 44:8-15.

J.RODRÍGUEZ, SANTIAGO P, CORNEJO, JUÁREZ J, S SÁNCHEZA U, GARZA R. Polymyxin resistance in Enterobacterales: overview and epidemiology in the Americas. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Volume 58, Issue 5, November 2021, 106426.

JAYOL A, POIREL L, BRINK A, VILLEGAS MV, YILMAZ M AND NORDMANN P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. **Antimicrob Agents Chemother** 58: 4762-6, 2014

JARLIER VICENT, DIAZ HOGBERG L, HEUER O. E, *et al.* Strong correlation between the rates of intrinsically antibiotic-resistant species and the rates of acquired resistance in Gram-negative species causing bacteraemia, EU/EEA, 2016. **Euro Surveill.** 2019;24(33)

JEANNOT, K.; BOLARD, A.; PLÉSIAT, P. Resistance to polymyxins in Gramnegative organisms. **Internacional Journal Antimicrobial Agents**. v. 49, n. 5, p. 526–535, 2017.

KATO A, GROISMAN EA. Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. **Genes Dev.** 2004 Sep 15; 18(18):2302-13.

KOHANSKI, M.A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, n. 6, p. 423–35, 2010.

LAURENT POIREL, AURÉLIE JAYOL, SÉVERINE BONTRON, MARIA-VIRGINIA VILLEGAS, MELDA OZDAMAR, SALIH T., PATRICE N. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Volume 70, Issue 1, January 2015, Pages 75–80.

LEE, CR.; LEE, J.H.; PARK, K.S.; KIM, Y.B.; JEONG, B.C.; LEE, S.H. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. **Front Microbiol** v. 7, p. 895, 2016.

LEE, S. A., LUCAS, P. C., RANA, P. S., THASSILA, N. P. Resistência de enterobactérias a beta-lactâmicos mediada por beta-lactamases de espectro estendido e carbapenemases. **anais 21^a -semoc**, Universidade Católica do Salvador (UCSAL). 26 out de 2018.

LIU, Y.Y.; WANG, Y.; WALSH, T.R.; YI, L.X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, 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. **Journal of Infectious Diseases**. v. 16, p. 161-68, 2016.

LOGAN LK, WEINSTEIN RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. **J Infect Dis.** 2017; 215(1):28-36

LONGO LGA, DE SOUSA VS, KRAYCHETE GB, JUSTO S. LH, ROCHA JA, SUPERTI SV, BONELLI RR, MARTINS IS, MOREIRA BM. A resistência à colistina surge em clones epidêmicos *klebsiella pneumoniae* resistentes a pandrug no Rio de Janeiro, Brasil. **Agentes Antimicrob Int J.** 2019.

MARTINS WMBS, NICOLETTI AG, SANTOS SR, SAMPAIO JLM, GALES AC. Frequency of BKC-1-producing *Klebsiella* species isolates. **Antimicrob Agents Chemother** 2016;60:5044–6.

MATAMOROS S, VAN HATTEM JM, ARCILLA MS, WILLEMSE N, MELLES DC, PENDERS J, VINH TN, THI HOA N, CONSORTIUM COMBAT, DE JONG MD, SCHULTSZ C. Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr-1* gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. **Sci Rep.** 2017;7(1):15364.

MELETIS G, OUSTAS E, BOTZIORI C, KAKASI E, KOTELI A. 2015. Containment of carbapenem resistance rates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in a Greek hospital with a concomitant increase in colistin, gentamicin and tigecycline resistance. **New Microbiol** 38:417-421.

MEYER G and PICOLI SU (2011) Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre Phenotypes. **J Bras Patol Med Lab.** 47:25–31.

MLYNARCYK P, KOLAR M. Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of *mcr* genes. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.** 2019 Feb;163(1):28-38.

MOJICA MF, BONOMO RA, FAST W. 2015. B1-metallo- β -lactamases: Where do we stand? **Curr Drug Targets** 17: 1029–1050

MOUBARECK CA, MOUFTAH SF, Pál T, GHAZAWI A, HALAT DH, NABI A, *et al* (2018) Clonal emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST14 co-producing OXA-48-type and NDM carbapenemases with high rate of colistin resistance in Dubai, United Arab Emirates. **Int J Antimicrob Agents.** 52:90-95.

MOTA, FS da; OLIVEIRA, HA de; SOUTO, Renata Carneiro Ferreira. Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva. **RBAC**, v. 50, n. 3, p. 270-277, 2018.

MUNITA JM AND ARIAS CA (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology Spectrum.** 4:1-24.

NANG SC, AZAD MAK, VELKOV T, ZHOU QT, Li J. Resgatando os Polimyxins de Última Linha: Conquistas e Desafios. **Pharmacol Rev.** 2021 Abr;73(2):679-728.

NIKAIDO H. Multidrug Resistance in Bacteria. Review in Advance first posted online on February 20, 2009.

NIKAIDO H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2003 Dec;67(4):593-656.

NGUYEN NQ, KRISHNAN NP, ROJAS LJ, PRATI F, CASELLI E, ROMAGNOLI C, BONOMO RA, VAN DEN AKKER F. 2016. Estruturas cristalinas de KPC-2 e SHV-1 β -lactamases em complexo com o estado de transição de ácido bórico analógico S02030. **Agentes antimicrob** 60: 1760-1766

OLAITAN AO, MORAND S, ROLAIN JM. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. **Int J Antimicrob Ag** 2016;47(1):1-3

OLAITAN AO, MORAND S, ROLAIN JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Front Microbiol**. 2014 Nov 26;5:643.

OLAITAN, A.O.; DIENE, S.M.; KEMPF, M.; BERRAZEG, M.; BAKOUR, S.; GUPT, S.K.; *et al*. World wide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator *mgrB*: a epi- demiological and molecular study. **Internacional Journal Antimicrobial Agents** . v.44, n. 6, p.500-7, 2014.

PANTEL L, JUAREZ P, SERRI M, BOUCINHA L, LESSOUD E, LANOIS A, GIVAUDAN A, RACINE E, GUALTIER M. Missense Mutations in the CrrB Protein Mediate Odilorhabdin Derivative Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**. 2021 Mar 8;65(5):e00139-21.

PEREZ F, EL CHANKHTOURA NG, PAPP-WALLACE KM, WILSON BM, BONOMO RA. 2016. Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Can we apply “precision medicine” to antimicrobial chemotherapy? **Expert Opin Pharmacother** 17: 761–781.

POIREL L, BONNIN RA, NORDMANN P. 2012. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. **Infect Genet Evol** 12: 883–893.

POIREL L, JAYOL A, NORDMANN P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clin Microbiol Rev**. 2017 Apr;30(2):557-596.

QUAN J, Li X, CHEN Y, JIANG Y, ZHOU Z, ZHANG H, SUN L, RUAN Z, FENG Y, AKOVA M, Yu Y. Prevalence of *mcr-1* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* recovered from bloodstream infections in China: a multicentre longitudinal study. **Lancet Infect Dis**. 2017;17(4):400–410.

RIGATTO, M. H. da S. P. Polimixina B em comparação com outros antibióticos no tratamento da pneumonia e traqueobronquite associadas à ventilação mecânica causadas por *Pseudomonas aeruginosa* ou *Acinetobacter baumannii*. 88 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.**

ROBERTS KD, AZAD MA, WANG J, HORNE AS, THOMPSON PE, NATION RL, VELKOV T and LI J (2015) Antimicrobial Activity and Toxicity of the Major Lipopeptide Components of Polymyxin B and Colistin: Last-line Antibiotics against Multidrug- Resistant Gram-negative Bacteria. **ACS Infect Dis**. 1:568–575.

ROSSI F, GIRARDELLO R, MORAIS C, CURY AP, MARTINS LF, MARIA S, A, *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** 2017;72:642.

ROSSI F (2011) The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical infectious diseases**. 52:1138-1143.

RUSSOTTO, V.; CORTEGIANI, A.; GRAZIANO, G.; SAPORITO, L.; RAINERI, S.M.; MAMMINA, C.; GIARRATANO, A. Bloodstream infections in intensive care unit patients: distribution and antibiotic resistance of bacteria. **Infection and Drug Resistance**. v.8, p. 287-296, 2015.

SANTOS, D. O. S. Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial, 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 2011.

SUTHERLAN CA, NICOLAU DP. 2015. Susceptibility profile of ceftolozane/tazobactam and other parenteral antimicrobials against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* from U.S. hospitals. **Clin Ther** 37:1564–1571

TANISE VENDRUSCOLO, D. (2018) Resistência às polimixinas: caracterização molecular (foco no gene *mcr-1*) e avaliação de métodos de detecção. **Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**.

TENOVER FC (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American J Infect Control**. 34:S3-10.

VELKOV T, ROBERTS KD, NATION RL, THOMPSON PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. **Future Microbiol**. 2013 Jun;8(6):711-24.

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.

WALKTY A, DECORBY M, NICHOL K, KARLOWSKY JA, HOBAN DJ, ZHANEL GG. 2009. In vitro activity of colistin (polymyxin E) against 3,480 isolates of Gram-negative bacilli obtained from patients in Canadian hospitals in the CANWARD study, 2007–2008. **Antimicrob Agents Chemother** 53:4924–4926

WILK, M. S.; LOVERING, A. L.; STRYNADKA, N. C. J. B-Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol*, New York, v. 8, p. 525-533, 2005.

WYRES, K.L LAM, M.M.C. AND HOLT, K.E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nat Rev Microbiol** 18, 344-359 (2020).

WRIGHT MS, SUZUKI Y, JONES MB, MARSHALL SH, RUDIN SD, VAN DUIN D, KAYE K, JACOBS MR, BONOMO RA, ADAMS MD. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. **Antimicrob Agents Chemother** 2015;59:536–43.

YAN A, GUAN Z AND RAETZ CR (2007) An undecaprenyl phosphateaminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in Escherichia coli. **J Bio Chem.** 282:36077–36089.

YU Z, QIN W, LIN J, FANG S, QIU J. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. **Biomed Res Int.** 2015.

ZEINAB PISHNIAN, MEHRI HAEILI AND ADEL FEIZI. Prevalence and molecular determinants of colistin resistance among commensal Enterobacteriaceae isolated from poultry in northwest of Iran. **Gut Pathog** 11, 1(2019).

ZHOU Z, RIBEIRO AA, LIN S, COTTER RJ, MILLER SI and RAETZ CR (2001) Lipid modifications in polymyxin resistant Salmonella typhimurium: PmrA dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose and phosphoethanolamine incorporation. **J Biol Chem.** 276:43111–43121.