



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Tiago Ventura Lourenço Lima

TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES DE
RESISTÊNCIA À COLISTINA EM *SALMONELLA*
ENTERICA E *ESCHERICHIA COLI* DE ANIMAIS
PRODUTORES DE ALIMENTO

Tese no âmbito do Doutoramento em Ciências Farmacêuticas, ramo de Microbiologia e Parasitologia orientada pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva, pela Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues e pela Professora Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Dezembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Tiago Ventura Lourenço Lima

**TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES DE
RESISTÊNCIA À COLISTINA EM *SALMONELLA*
ENTERICA E *ESCHERICHIA COLI* DE ANIMAIS
PRODUTORES DE ALIMENTO**

Tese no âmbito do Doutoramento em Ciências Farmacêuticas, ramo de Microbiologia e Parasitologia orientada pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva, pela Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues e pela Professora Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Dezembro de 2022

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

Dedico este trabalho à minha Família, a minha base e o meu alicerce: aos meus pais Américo e Angelina e aos meus irmãos Inês e Diogo, por todo o amor, carinho, conselhos, ajuda, paciência, confiança e incentivos que recebi.

Agradecimentos

Este documento é o não só o culminar de um longo percurso, mas também o alcançar de uma meta muito importante. Não consegui nada sozinho e é às pessoas que estiveram de forma muito próxima a apoiar-me e incentivar-me expresso o meu maior, mais profundo e sincero agradecimento, ciente de que estas minhas palavras são, de certo modo, insuficientes para poder expressar todo o meu reconhecimento. Porém, ficará a tentativa...

À Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva, minha orientadora,

uma palavra de agradecimento especial pelo acolhimento, orientação e partilha de conhecimentos científicos (e de vida). Agradeço toda a disponibilidade, amizade e preocupação que sempre teve para comigo. Guardarei para sempre os seus ensinamentos e palavras de motivação constantes. O seu enorme apoio nos momentos mais difíceis, que jamais esquecerei, foi muito importante para a conclusão deste trabalho. Indubitavelmente, todas as palavras de agradecimento a si endereçadas serão sempre poucas, visto que é um verdadeiro orgulho trabalhar consigo e dada a imensa admiração pessoal e profissional que por si nutro.

À Professora Doutora Sara Domingues, minha coorientadora,

gostaria igualmente de agradecer a orientação científica, partilha de conhecimentos disponibilidade e amizade. Foi, também, para mim um importante pilar e fonte de motivação ao longo deste percurso. Jamais esquecerei a etapa final deste projeto e o esforço que fez para que esta tese (e não só) nascesse.

À Professora Doutora Maria Constança Pomba, minha coorientadora,

agradeço a orientação científica, partilha de conhecimentos e a sua “visão e rigor de veterinária”, sempre adequada ao contexto em que este trabalho foi desenvolvido. Mesmo fisicamente um pouco mais distante, sei que este trabalho não se realizaria sem os seus *inputs*.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra,

docentes e não docentes e, de forma particular, a todos os que integram o Laboratório de Microbiologia pela forma como me acolheram e pelo suporte prestado sempre que necessário.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT),

que financiou este projeto com a atribuição de uma bolsa de doutoramento (SFRH/BD/I32555/2017) e uma bolsa excecional (COVID/BD/I52445/2022).

À minha amiga Ana Marta Lavrador,

companheira nesta luta, um agradecimento pelo apoio, entreaajuda e companheirismo. As paredes e alicerces da Faculdade de Farmácia não eram suficientes para aguentar os meus suspiros e desabafos! Obrigado por estares sempre lá para os ouvir. Nem sempre havia a necessidade de verbalizar, a nossa cumplicidade, muitas vezes, residia num simples um olhar... E isto já diz muito sobre a nossa relação de verdadeira e profunda amizade. Não é de sempre, mas sei que será para sempre.

À minha amiga Rita Ribeiro,

outra companheira de batalha, mesmo emigrada em Lisboa, sei que estás à distância de um clique. Partilhámos, por vezes, as mesmas dores e angústias, as coisas nem sempre correm como desejamos. Admiro a tua forma serena de enfrentar as adversidades. Obrigado pelo exemplo.

Às minhas amigas Rita Carvalho e Mariana Lavrador,

duas companheiras de bastidores. Um obrigado Rita pela tua frontalidade, boa disposição e capacidade de me puxares para terra firme quando fico mais à deriva. És a minha loira falsa favorita! A ti Mariana, obrigado por me fazeres sentir vaidoso por ser amigo da melhor médica do mundo! Pela tua humanidade e objetividade. Obrigado às duas pelas risadas e momentos inesquecíveis que juntamente com a Marta e Rita R. vamos vivendo. A nossa alegria esteve e estará sempre no comando do nosso dia-a-dia.

**Às minhas amigas, Inês Roldão, Mariana Pinto, Sara Nóbrega,
Sofia Salgado, Carolina Dias e Inês Barejo,**

por fazerem da distância proximidade. Quis a vida que cada um estivesse em locais geograficamente diferentes, mas os laços que criámos ao longo dos anos foram sempre crescendo quanto os quilómetros que nos separam. Obrigado pela amizade.

À Clarissa Faria, à Ágata Lourenço,

companheiras de bancada, pelo bom ambiente, espírito de entreaajuda e cooperação que criámos no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia. A verdade é que muitas das horas no Laboratório foram passadas na vossa companhia e sob o vosso incentivo.

Ao Rafael Aroso,

pelo seu otimismo contagiante. Sempre dono de uma palavra amiga e de incentivo. Foi um enorme gosto trabalhar ao teu lado e aprender contigo.

À Sandra Rodrigues,

pela boa disposição constante. A sua alegria é contagiante. O meu percurso na Faculdade de Farmácia ficou marcado não só pelas suas inúmeras maluquices, mas também pela sua amizade. São, também, inúmeros os desabafos trocados. Obrigado por ter sido um bom ouvido e ombro ao longo destes anos.

Aos meus pais: Américo Lima e Angelina Lima

as minhas maiores referências enquanto pessoa. A eles lhes devo tudo aquilo que hoje sou e construí. Sempre me encorajaram a lutar pelos meus objetivos e apesar da minha ausência física sempre estiveram presentes para não me deixar cair. São o meu suporte, o exemplo daquilo que quero transmitir aos que comigo se cruzam. Caindo nos meandros da hipérbole, arrisco-me a dizer que são os melhores pais do mundo!

Ao meu irmão Diogo Lima

o meu mais velho, que sei que ficará orgulhoso por esta conquista. Foi com ele que aprendi a sonhar um pouco mais alto. Obrigado pela força e exemplo.

À minha irmã Inês Lima

o meu “benjamim”, que apesar da sua falta de originalidade em escolher cursos no ensino superior, veio dar luz aos meus dias mais cinzentos com a sua vinda para a cidade dos estudantes. O “mini eu” que me entende com um simples olhar, a minha cúmplice... Fez-me sentir o peso da responsabilidade daquilo que é ser a referência de alguém. É bom, e acima de tudo motivador senti-lo.

Projeto Financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através das bolsas
com as referências:

SFRH/BD/I32555/2017

COVID/BD/I52445/2022

The logo consists of the letters 'FCT' in a bold, dark green, sans-serif font. The 'F' and 'C' are connected at the top, and the 'T' is positioned to the right of the 'C'.

Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

Preâmbulo

A presente tese está estruturalmente dividida em vários capítulos, em que o capítulo I e o capítulo VI correspondem à introdução e à conclusão, respetivamente, do trabalho de investigação realizado. Nos capítulos intermédios, II, III, IV e V incluem-se os trabalhos científicos publicados ou em fase de submissão, estando, por este motivo, redigidos em língua inglesa.

No **capítulo I** é, portanto, feita uma revisão do estado da arte relativamente à utilização da colistina, mecanismo de ação, mecanismos de resistência e de transferência lateral de genes. Descreve-se a relação estrutura-atividade da colistina, bem como do seu uso em contexto de medicina humana e veterinária. Os testes de suscetibilidade à colistina e a definição de *breakpoints* clínicos são, também, revistos neste capítulo. Similarmente, os mecanismos de resistência à colistina em bactérias de Gram-negativo, onde se inclui a resistência à colistina mediada por plasmídeo, são elucidados.

A avaliação da potencial disseminação da resistência à colistina é um dos principais objetivos deste trabalho, logo neste capítulo são também, revistos os mecanismos de transferência horizontal de genes, possivelmente implicados na disseminação da resistência à colistina, as principais plataformas onde estes eventos podem ocorrer assim como o custo biológico para o hospedeiro, decorrente da aquisição destes genes.

Deste modo, no **capítulo II** desta dissertação com o título: “Longitudinal Study Detects the Co-Carriage of ESBL and *mcr-1* and *-4* Genes in *Escherichia coli* Strains in a Portuguese Farrow-to-Finish Swine Herd” é descrito um estudo longitudinal onde se pretendeu avaliar a colonização e transmissão de *E. coli* resistente à colistina e cefotaxima em varas de porcas e respetivos leitões, desde o seu nascimento até ao abate, com particular foco na caracterização dos genes *mcr* e nos genes que codificam beta-lactamases de espectro alargado, características de virulência e relação clonal. No decorrer deste estudo foi detetado um novo alelo do gene *mcr-4*, cuja sequência foi depositada no GenBank.

Com o título: “Occurrence and Biological Cost of *mcr-1*-Carrying Plasmids Co-harboring Beta-Lactamase Resistance Genes in Zoonotic Pathogens from Intensive Animal Production”, o **capítulo III** da presente dissertação, encontra-se, também, publicado. Neste capítulo é avaliada a prevalência, disseminação e custo biológico da aquisição de genes *mcr* e ESBL em isolados de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* obtidos a partir de animais produtores de alimento.

No decorrer do trabalho descrito no capítulo anterior, foi detado num isolado de *E. coli* o gene *bla*_{OXY-2}, que codifica uma beta-lactamase, frequentemente detetada em estirpes clínicas de *Klebsiella oxytoca*, cuja real prevalência pode estar subestimada, tal como descrito neste **capítulo IV** com o título: “Identification of *bla*_{OXY-2-12} Producing *Escherichia coli* from Poultry: is OXY-type β -lactamase Prevalence Underestimated?”, o qual se encontra em fase de submissão.

No **capítulo V** desta tese intitulado “Interspecies Transfer of Colistin Resistance *mcr-1* Gene by Natural Transformation and Virulence Features of *mcr-1* Harboring Strains”, que se encontra em fase de submissão, o papel da transformação natural na disseminação do gene *mcr-1* é avaliado.

Além disso, a capacidade de formação de biofilme dos transconjugantes com gene *mcr-1* descritos no capítulo II foi, também avaliada.

Finalmente no **capítulo VI** são apresentadas as conclusões gerais deste trabalho de investigação, bem como um conjunto de perspectivas futuras para o desenvolvimento do conhecimento nesta área de estudo.

Lista de Publicações

O trabalho apresentado nesta tese deu origem às seguintes publicações:

- Tiago Lima, Sara Domingues, Gabriela Jorge da Silva. Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. **Microorganisms** 2019; 19;7(2):55. doi: 10.3390/microorganisms7020055.
- Tiago Lima, Sara Domingues, Gabriela Jorge da Silva. Manure as a Potential Hotspot for Antibiotic Resistance Dissemination by Horizontal Gene Transfer Events. **Veterinary Sciences** 2020; 7(3): 110. doi: 10.3390/vetsci7030110.
- Tiago Lima, Laura Fernandes, Marta Matias, Ana Mateus, Eduarda Silveira, Sara Domingues, Constança Pomba, Gabriela Jorge Da Silva. Longitudinal Study Detects the Co-Carriage of ESBL and *mcr-1* and *-4* Genes in *Escherichia coli* Strains in a Portuguese Farrow-to-Finish Swine Herd. **Animals** 2022; 12(17):2209. doi: 10.3390/ani12172209.
- Tiago Lima, Laura Fernandes, Marta Matias, Ana Mateus, Eduarda Silveira, Sara Domingues, Constança Pomba, Gabriela Jorge Da Silva. *Escherichia coli* strain IG5-3 phosphoethanolamine-lipid A transferase MCR-4.7 (*mcr-4*) gene, *mcr-4.7* allele, complete cds. **GenBank accession number**: ON586856.
- Tiago Lima, Dina Loureiro, Ana Henriques, Fernando Ramos, Constança Pomba, Sara Domingues, Gabriela Jorge da Silva. Occurrence and Biological Cost of *mcr-1*-Carrying Plasmids Co-harboring Beta-Lactamase Resistance Genes in Zoonotic Pathogens from Intensive Animal Production. **Antibiotics** 2022; 11(10), 1356. doi: 10.3390/antibiotics11101356.

Índice

Preâmbulo	XIII
Lista de Publicações	XV
Índice	XVII
Lista de Figuras	XXI
Lista de Tabelas	XXIII
Resumo	XXV
Abstract	XXVII
Lista de Abreviaturas	XXIX
CAPÍTULO I	I
Introdução	I
1.1. Estrutura e química da colistina.....	5
1.2. Mecanismo de ação.....	6
1.3. Espectro de atividade.....	8
1.4. Uso de colistina em contexto de Medicina Humana e Medicina Veterinária.....	9
1.4.1. Medicina Humana.....	9
1.4.1.1. Neurotoxicidade e nefrotoxicidade associada à colistina.....	11
1.4.2. Medicina veterinária.....	12
1.5. Testes de suscetibilidade à colistina e <i>breakpoints</i> clínicos.....	14
1.6. Mecanismos de resistência à colistina em bactérias de Gram-negativo.....	17
1.6.1. Resistência intrínseca à colistina.....	19
1.6.2. Mecanismos de resistência adquirida à colistina de origem cromossômica em <i>Enterobacteriales</i>	19
1.6.2.1. Sistemas de dois componentes PmrAB, PhoPQ e CrrAB e sua regulação através do gene <i>mgrB</i>	20
1.6.2.2. Mutação nos genes cromossômicos responsáveis pela biossíntese do LPS – <i>ramA</i> , <i>lpxA</i> , <i>lpxC</i> , <i>lpxD</i> e <i>lpxM</i>	24
1.6.2.3. O papel da cápsula e das bombas de efluxo na resistência à colistina.....	24
1.6.3. Resistência à colistina mediada por plasmídeo: breve caracterização genética do gene <i>mrc-I</i>	25

1.7.	Epidemiologia dos genes de resistência à colistina mediada por plasmídeo.....	29
1.8.	Disseminação de genes <i>mcr</i> : Transferência Horizontal de Genes.....	31
1.8.1.	Conjugação	33
1.8.2.	Transdução	36
1.8.3.	Transformação Natural.....	37
1.9.	Plataformas de disseminação de genes <i>mcr</i>	39
1.9.1.	Animais produtores de alimento	39
1.9.2.	Estrume animal e efluentes agrícolas	41
1.9.3.	Efluentes hospitalares.....	43
1.9.4.	Frutas e vegetais frescos.....	44
1.10.	Custo biológico da aquisição de genes de resistência à colistina.....	45
1.11.	Objetivos da tese	47
1.12.	Referências Bibliográficas.....	49
CAPÍTULO II.....		67
Longitudinal Study Detects the Co-Carriage of ESBL and <i>mcr-1</i> and <i>-4</i> Genes in <i>Escherichia coli</i> Strains in a Portuguese Farrow-to-Finish Swine Herd.....		67
2.1.	Abstract.....	69
2.2.	Introduction.....	70
2.3.	Materials and Methods.....	71
2.3.1.	Selection of Herds and Sampling Scheme.....	71
2.3.2.	Isolation and Identification of <i>Escherichia coli</i>	72
2.3.3.	Antimicrobial Susceptibility Testing.....	72
2.3.4.	Detection of Antimicrobial Resistance Genes.....	73
2.3.5.	Genetic Relatedness and Virulence Markers Detection.....	75
2.4.	Results.....	75
2.4.1.	Occurrence of <i>bla</i> _{CTX-M} and <i>mcr</i> Type Genes and Other Resistance Genes in <i>E. coli</i>	75
2.4.2.	Extended Phenotypic and Genotypic Characterization	77
2.4.2.1.	Antimicrobial Resistance	77
2.4.2.2.	Identification of <i>bla</i> _{CTX-M} Genes and Plasmid Incompatibility Groups.....	79
2.4.2.3.	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	79
2.4.2.4.	Pathogenicity Island Markers and Phylogenetic Analysis	79
2.5.	Discussion	81
2.6.	Conclusions	83
2.7.	References	84

CAPÍTULO III	89
Occurrence and Biological Cost of <i>mcr-I</i>-Carrying Plasmids Co-harboured Beta-Lactamase Resistance Genes in Zoonotic Pathogens from Intensive Animal Production	89
3.1. Abstract.....	91
3.2. Introduction.....	92
3.3. Materials and Methods	94
3.3.1. Bacterial Isolates	94
3.3.2. Antimicrobial Susceptibility Testing.....	94
3.3.3. Detection of Antimicrobial Resistance Genes.....	95
3.3.4. Conjugation Assay and Plasmid Replicon Typing	95
3.3.5. Determination of Growth Rates	96
3.3.6. Plasmid Stability Assay	96
3.4. Results.....	97
3.4.1. Origin of Bacterial Isolates and Antimicrobial Susceptibility Test	97
3.4.2. Screening of <i>mcr</i> and ESBL Genes	99
3.4.3. Conjugation Experiments.....	101
3.4.4. Growth Rates and Plasmid Stability.....	101
3.5. Discussion.....	103
3.6. Conclusions	106
3.7. References.....	108
CAPÍTULO IV	113
Identification of <i>bla</i>_{OXY-2-12} Producing <i>Escherichia coli</i> from Poultry: is OXY-type β-lactamase Prevalence Underestimated?	113
4.1. Abstract	115
4.2. Brief Report.....	116
4.3. References.....	121
CAPÍTULO V	123
Interspecies Transfer of Colistin Resistance <i>mcr-I</i> Gene by Natural Transformation and Virulence Features of <i>mcr-I</i> Harboured Strains	123
5.1. Abstract	125
5.2. Introduction.....	126

5.3.	Material and Methods	128
5.3.1.	Bacterial Isolates.....	128
5.3.2.	DNA extraction and quantification.....	128
5.3.3.	Natural Transformation Assays	129
5.3.4.	Transformants Characterization	130
5.3.5.	Detection of Biofilm Formation Ability	130
5.4.	Results and Discussion.....	131
5.5.	References	135
CAPÍTULO VI		139
Conclusões Gerais e Perspetivas Futuras.....		139
6.1.	Referências Bibliográficas	145

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1.1.	Estrutura química da colistina	6
Figura 1.2.	Ação da colistina na membrana celular das bactérias de Gram-negativo	8
Figura 1.3.	Mecanismos de resistência às polimixinas em bactérias de Gram-negativo.....	18
Figura 1.4.	Modificação do LPS em <i>Enterobacteriales</i>	22
Figura 1.5.	Ambiente genético do gene <i>mcr-1</i>	28
Figura 1.6.	Representação esquemática dos três principais mecanismos de THG	32
Figura 1.7.	Disseminação da resistência antimicrobiana associada à aplicação de estrume animal em solos agrícolas	42

Capítulo II

Figure 2.1.	Chapter graphical abstract	69
Figure 2.2.	Prevalence of <i>bla</i> _{CTX-M} and <i>mcr</i> -producing <i>E. coli</i> throughout the piglets' life	76
Figure 2.3.	Dendrogram of clonal relationship of <i>E. coli</i> isolates from piglets over the five sampling moments	80

Capítulo III

Figure 3.1.	Chapter graphical abstract	91
Figure 3.2.	Growth kinetics assay results	102
Figure 3.3.	Stability of <i>mcr-1</i> plasmids	103

Capítulo IV

Figure 4.1.	Chapter graphical abstract	115
Figure 4.2.	The <i>bla</i> _{OXY-2-12} gene and primers used in this study	117

Capítulo V

Figure 5.1.	Chapter graphical abstract	125
Figure 5.2.	Biofilm formation ability of <i>mcr-1</i> -positive <i>E. coli</i> and its transconjugants compared with <i>E. coli</i> J53	133

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1.1.	Resistência adquirida à colistina	23
Tabela 1.2.	Identificação dos primeiros genes <i>mcr-I</i> a <i>-10</i>	27

Capítulo II

Table 2.1.	Primers used in this study for detection of <i>gadA/B</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{OXA-1}</i> , <i>ampC</i> and <i>mcr-I</i> to <i>-10</i> genes	74
Table 2.2.	Nucleotide/amino acid changes in <i>mcr-4</i> /MCR-4 alleles	77
Table 2.3.	Characteristics of <i>bla_{CTX-M}</i> producing <i>E. coli</i> isolates recovered from piglets from a Portuguese farms over 5 sampling moments.....	78

Capítulo III

Table 3.1.	Origin of <i>Escherichia coli</i> and serovar of <i>Salmonella enterica</i> isolates	98
Table 3.2.	Frequency of <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella enterica</i> according to biological, food and environmental samples	99
Table 3.3.	Origin, phenotypic and genetic characteristics of antimicrobial resistance of <i>mcr-I</i> positive and/or ESBL-producing <i>E. coli</i> isolates	100

Capítulo IV

Tabela 4.1.	Antimicrobial resistance genes type in <i>E. coli</i> 206FFUC by WGS	119
--------------------	---	-----

Capítulo V

Tabela 5.1.	Bacterial isolates used in natural transformation assays	128
--------------------	--	-----

Resumo

O uso inadequado e sistemático de antibióticos é uma das principais causas para a emergência da resistência antimicrobiana. O seu uso em animais produtores de alimento promove a seleção de estirpes resistentes com potencial zoonótico, nomeadamente *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*. A falta de antibióticos eficazes para o tratamento de infeções causadas por bactérias de Gram-negativo multirresistentes, levou à reintrodução da colistina como uma das opções terapêuticas de último recurso. Numerosos estudos relataram a presença de alelos de um gene capaz de conferir resistência à colistina – gene *mcr*, em plasmídeos, principalmente em *E. coli* e *S. enterica* de origem animal. Assim, o objetivo deste trabalho foi compreender de que forma a administração de colistina após o nascimento de animais produtores de alimento pode influenciar a resistência de *E. coli* presente na sua microbiota intestinal, e se essa resistência e estirpes se mantêm durante o processo de crescimento até ao abate para consumo humano. Além disso, pretendeu-se, também, avaliar não só o potencial desses genes se moverem horizontalmente entre espécies bacterianas através de conjugação e transformação natural, mas também a virulência e o custo biológico conferido pela aquisição de plasmídeos contendo o gene *mcr-1*.

Começámos por realizar um estudo longitudinal em porcas e seus leitões desde o nascimento até ao abate com foco na caracterização dos genes de beta-lactamases de espectro alargado (ESBL) e *mcr*, características de virulência e relação genética. Um total de 293 isolados de *E. coli* foram isolados a partir de amostras fecais obtidas em cinco momentos de amostragem, verificando-se a manutenção de isolados geneticamente relacionados durante as diferentes fases da vida dos leitões. À nascença, os genes *bla*_{CTX-M} foram detetados em isolados de *E. coli* de 9 porcas e 49 leitões (73,41%), e nos quatro momentos seguintes de amostragem este gene foi detetado em 91,8%, 57,6%, 71,4% e 97,4% dos leitões. Similarmente, à nascença, o gene *mcr-1* foi detetado em *E. coli* de uma porca e de três leitões de diferentes ninhadas, em 68,85%, 100%, 90% e 8,1% dos leitões nos restantes momentos. Um novo alelo do gene *mcr-4*, *mcr-4.7*, foi identificado em 3,28%, 28,57%, 7,5% dos isolados de *E. coli*, mas não detetado no último momento de amostragem, verificando-se a sua coocorrência com os genes *bla*_{CTX-M} e *mcr-1* em 96,7% e 93,33% dos isolados, respetivamente.

Posteriormente, foi avaliada a prevalência, a capacidade de produção de biofilme e o custo biológico da aquisição dos genes *mcr* e ESBL em 98 isolados de *E. coli* e 142 de *S. enterica*. Os genes *mcr-1* a *-10* foram pesquisados por PCR e, apenas o gene *mcr-1* foi identificado em 15,3% dos isolados de *E. coli*, verificando-se a coexistência de *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-15} em quatro isolados. As concentrações mínimas inibitórias para a colistina foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo, de onde se obtiveram valores entre 8 e 32 mg/L. Os plasmídeos IncHI2, IncHII, IncP, IncN e IncI foram não só transferidos por conjugação para *E. coli* J53, mas também, em alguns casos, por transformação natural para *Acinetobacter baylyi* BD413. Além disso, o gene *bla*_{OXY-2}, frequentemente detetado no cromossoma de *Klebsiella oxytoca*, foi identificado num plasmídeo de *E. coli* ST162, o qual foi, também, transferido com sucesso para *E. coli* J53.

Relativamente ao custo biológico, verificou-se que quando comparadas, as taxas específicas de crescimento dos transconjugantes eram significativamente menores que as da célula recetora ($p < 0,05$) e que a taxa média de crescimento dos transconjugantes foi maior na ausência de colistina do que na sua presença (1,66 versus 1,32 ($p = 0,0003$)). A estabilidade dos plasmídeos adquiridos por conjugação foi avaliada através de transferências sucessivas em meio de cultura sem colistina, verificando-se que a taxa de retenção do plasmídeo variou desde a sua perda completa até à sua retenção total.

A capacidade de formação de biofilme foi avaliada através do ensaio do cristal violeta, em bactérias isogénicas: *E. coli* J53 e seus transconjugantes, verificando-se que a aquisição do plasmídeo contendo o gene *mcr* aumenta a quantidade de biofilme produzido.

Em conclusão, este estudo destaca a necessidade de reduzir ou de encontrar alternativas ao uso de antibióticos, como a colistina, em sistemas de produção animal, pois as estirpes resistentes são capazes de se manter ao longo das diferentes fases do ciclo de vida dos animais, podendo atingir a cadeia alimentar. Uma vez que a aquisição de genes *mcr-1* impõe custo biológico para o hospedeiro, e porque a perda de plasmídeos mostrou ser altamente variável, é possível que outros fatores além da pressão seletiva exercida pelo uso de colistina regulem a manutenção do plasmídeo numa população bacteriana, sugerindo que a sua retirada da produção animal não se traduzirá na reversão completa da resistência à colistina através da diminuição dos níveis de *mcr-1*.

Palavras-chave: resistência à colistina; *mcr*; transferência horizontal de genes; custo biológico; animais produtores de alimento.

Abstract

The inappropriate and systematic use of antibiotics is considered one of the main causes for the emergence of antimicrobial resistance. The use of antibiotics in food-producing animals promotes the selection of resistant strains with zoonotic potential, namely *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. The lack of effective antibiotics for the treatment of infections caused by multidrug resistant Gram-negative bacteria, led to the reintroduction of colistin, as one of the last resort therapeutic options. Numerous studies have reported the presence of alleles of one gene capable of conferring resistance to colistin - *mcr* gene in plasmids mainly from *E. coli* and *S. enterica*. Hence, the goals of this study were to understand how the administration of colistin after the birth of food-producing animals, can influence the resistance of *E. coli* present in their intestinal microbiota, and whether the resistance and strains are maintained during the growth process to slaughter for human consumption. Furthermore, it was also intended to evaluate not only the potential for such genes to move horizontally between bacterial species through conjugation and natural transformation but also the virulence and biological cost conferred by the acquisition of plasmids containing the *mcr-1* gene.

We have started by conducting a longitudinal study in sows and their piglets in a farrow-to-finish operation, with a focus on the characterization of Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) and *mcr* genes, assessment of virulence traits and genetic relatedness. A total of 293 *E. coli* isolates were isolated from faecal samples collected in five sampling moments, having verified the maintenance of genetically related isolates during the different phases of the piglets' life. At birth, *bla*_{CTX-M} genes were detected in *E. coli* isolates from 9 sows and 49 piglets (73.41%), while in the following four sampling moments this gene was detected in 91.8%, 57.6%, 71.4% and 97.4% of the piglets. Similarly, at birth, the *mcr-1* gene was detected in *E. coli* from one sow and three piglets from different litters, and in 68.85%, 100%, 90% and 8.1% of the piglets, at the remaining ensuing time points of sampling. A new allele of the *mcr-4* gene, *mcr-4.7*, was identified in 3.28%, 28.57%, 7.5% of *E. coli* isolates, but not detected at the last sampling moment, its co-occurrence being observed with the genes *bla*_{CTX-M} and *mcr-1* in 96.7% and 93.33% of the isolates, respectively.

Subsequently the prevalence, biofilm formation ability and biological cost of acquiring *mcr* and ESBL genes were assessed in 98 *E. coli* and 142 *S. enterica* isolates. The *mcr-1* to

mcr-10 genes were screened via PCR and only *mcr-1* gene was identified in 15.3% of the *E. coli* isolates. The coexistence of *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-15} in four isolates was verified. The minimal inhibitory concentrations for colistin were determined by the broth microdilution method, from which values between 8 and 32 mg/L were obtained. The IncHI2, IncHI3, IncP, IncN and IncI plasmids were not only transferred by conjugation into *E. coli* J53, but also, in some cases, by natural transformation into *Acinetobacter baylyi* BD413. Furthermore, the *bla*_{OXY-2} gene, frequently detected in the *Klebsiella oxytoca* chromosome, was identified in an *E. coli* ST162 plasmid, which was also successfully transferred into *E. coli* J53.

In regard to the biological cost, on one hand, it has been detected that when compared, the growth rates of the transconjugants were significantly lower than the recipient cell ($p < 0.05$) whilst on the other hand, the average growth rate of the transconjugants was higher in the absence of colistin than in its presence (1.66 versus 1.32 ($p = 0.0003$)). In addition, the stability of the plasmids acquired by conjugation was evaluated, through consecutive transfers in a culture medium without colistin. It was verified, that the plasmid retention rate ranged from complete loss to full retention.

The biofilm formation ability was evaluated, via a crystal violet assay in isogenic bacteria: *E. coli* J53 and its transconjugants, noting that the acquisition of the *mcr*-harbouring plasmid increases the amount of produced biofilm.

In conclusion, this study highlights a need to reduce or find alternatives to the use of antibiotics, such as colistin, in animal production systems. Since resistant strains are able to maintain themselves throughout the different stages of the food-producing animal's life cycle, and reaching the human food chain. As the acquisition of *mcr-1* genes imposes a biological cost on the host and, because the loss of plasmids has been shown to be highly variable, it is possible that factors other than the selective pressure exerted by the use of colistin, regulate the maintenance of the plasmid in a bacterial population. This suggests that colistin withdrawal of from animal production, by lowering *mcr-1* levels, will not lead into a complete reversal of colistin resistance.

Keywords: colistin resistance; *mcr*; horizontal gene transfer; biological cost; food producing animals.

Lista de Abreviaturas

Ak – Amikacin

Amc – Amoxicillin/clavulanic acid

Aml – Amoxicillin

ATCC – American Type Culture Collection

ATM – Aztreonam

BRAs – Bactérias Resistentes a Antibióticos

C – Chloramphenicol

Caz – Ceftazidime

CEX – Cefalexin

CF – Conjugation Frequency

CFUs – Colony Forming Units

Cip – Ciprofloxacin

CLSI – Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

CMI/MIC – Concentração Mínima Inibitória/Minimal Inhibitory Concentration

CMS – colistimetato de sódio

Cn – Gentamicin

Ctx – Cefotaxime

Dab – ácido 2,4- diaminobutírico

EGMs – Elementos Genéticos Móveis

EMA – Agência Europeia do Medicamento *do inglês European Medicines Agency*

Enr – Enrofloxacin

ESBLs – Beta-lactamases de Espectro Alargado

EU/UE – União Europeia/*European Union*

EUA – Estados Unidos da América

EUCAST – Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana

F – Nitrofurantoina

Ffc – Florfenicol

Fos – Fosfomicin

Fox – Cefoxitin

GRAs – Genes de Resistência a Antibióticos

Imp – Imipenem

Inc – Grupos de Incompatibilidade

L-Ara4N – 4-amino-4-deoxy-L-arabinose

LB – Luria-Bertani

LPS – Lipopolissacarídeo

mcr – *Mobilized Colistin Resistance*

MDC – Microdiluição em Caldo

MDR – Multidrug-resistant

Mem – Meropenem

MGE – Mobile Genetic Element

MH – Mueller-Hinton

MHCA – Mueller-Hinton com ajuste de catiões

MLST – multi-locus sequence typing

Na – Nalidixic acid

OD – Optical Density

OMS/WHO – Organização Mundial de Saúde/World Health Organization

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

pEtN – fosfoetanolamina

PFGE – Pulsed-Field Gel Electrophoresis

PSC – Polissacarídeos Capsulares

rMLST – ribosomal Multilocus Sequence Typing

rpm – rotations per minute

SC – Sulfato de Colistina

SOD – Superóxido Dismutase

Sxt – Sulfamethoxazole/trimethoprim

TE – Tetracycline

TF – Transformation Frequency

THG/HGT – Transferência Horizontal de Genes/*Horizontal Gene Transfer*

UPGMA – Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

WGS – *Whole Genome Sequencing*

Xnl – Ceftriaxone

CAPÍTULO I

Introdução

O conteúdo deste capítulo está parcialmente suportado nas seguintes publicações científicas:

Artigos científicos

- Tiago Lima, Sara Domingues, Gabriela Jorge da Silva. Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. **Microorganisms** 2019; 19;7(2):55. doi: 10.3390/microorganisms7020055.
- Tiago Lima, Sara Domingues, Gabriela Jorge da Silva. Manure as a Potential Hotspot for Antibiotic Resistance Dissemination by Horizontal Gene Transfer Events. **Veterinary Sciences** 2020; 7(3): 110. doi: 10.3390/vetsci7030110.

A (re)emergência de doenças infecciosas e o aumento da resistência aos antibióticos constituem, inequivocamente, em paralelo com as alterações climáticas e com o colapso dos recursos naturais, verdadeiros desafios para a humanidade nas próximas décadas. Não obstante, a vida humana está inextricavelmente ligada aos microrganismos ¹. O nosso lúmen intestinal, pele e superfície das mucosas estão colonizados por diversas espécies de microrganismos, de tal modo que a microbiota de um indivíduo poderá ser tão única quanto a sua impressão digital ². Dada a ubiquidade dos microrganismos, o Homem pode estar exposto a potenciais agentes infecciosos – agentes patogénicos – através do ar, alimentos e água, contacto com outras pessoas ou, em determinadas circunstâncias, através de vetores, como os insetos ¹. Assim, as doenças infecciosas são o reflexo da natureza extremamente versátil dos microrganismos, essencialmente devida à sua elevada taxa de replicação e mutação, capaz de lhes conferir vantagem evolutiva contra condições desfavoráveis ^{3,4}. Indubitavelmente, a disseminação descontrolada de agentes patogénicos pode, rapidamente, resultar na perda de milhões de vidas humanas, bem como causar o colapso dos sistemas económico, de saúde e de educação, tal como aconteceu ao longo da história da humanidade aquando as pandemias de peste, cólera, gripe, e mais recentemente, com a pandemia por SARS-CoV-2 ⁵.

A descoberta acidental da penicilina por Alexander Fleming em 1928 constituiu um dos grandes marcos da história da medicina ⁶. A sua introdução como antibiótico no início da década de 1940 marcou o início da chamada “era antibiótica” e contribuiu, significativamente, para o tratamento e controlo de doenças infecciosas que foram, até então, durante a maior parte da existência humana, causas de morbidade e mortalidade humana ⁷. Desde então, os agentes antimicrobianos, em particular os antibióticos, têm sido um dos pilares da medicina moderna nas últimas décadas, uma vez que, não só permitem o tratamento de infeções, mas também, possibilitam a realização de cirurgias, como cesarianas e transplantes de órgãos e o tratamento do cancro ^{8,9}. Assim, a descoberta da penicilina marcou o início da chamada era de ouro da descoberta de novas classes de antibióticos entre as décadas de 1950 e 1970, acompanhada pelo inevitável e rápido surgimento de estirpes bacterianas resistentes ^{7,9-11}. Por conseguinte, o uso excessivo e inadequado de antibióticos, quer em contexto de saúde humana e veterinária, quer em contexto de produção animal e agrícola, é, atualmente, apontado como uma das principais causas para o surgimento e aumento da resistência antimicrobiana em todo o mundo ^{12,13}. O desenvolvimento de resistência bacteriana é um fenómeno resultante da pressão seletiva

exercida pelo uso de antibióticos, que durante as últimas décadas, tem sofrido uma expansão muito acelerada, com o surgimento de novos mecanismos de resistência e a sua rápida disseminação por populações de bactérias de vários nichos ecológicos ¹⁴. Em 2019, estima-se que as infecções causadas por bactérias multirresistentes tenham sido responsáveis por cerca de 1,27 milhões de mortes e se não forem tomadas medidas para responder a esta ameaça emergente é esperado que este número alcance os 10 milhões de mortes anuais até 2050 ^{13,15}.

O uso prolongado de antibióticos e de doses sub-terapêuticas em animais produtores de alimento está a promover a seleção de estirpes resistentes com potencial zoonótico, que por sua vez, podem disseminar-se através do contato direto entre animais e humanos, ou, indiretamente, através da cadeia alimentar ^{16,17}. A disseminação de determinantes de resistência está associada a mecanismos de transferência horizontal de genes, como a conjugação ou a transformação natural ¹⁸. Deste modo, as bactérias que constituem a microbiota intestinal dos animais podem trocar material genético com outras bactérias comensais ou patogênicas.

A falta de antibióticos eficazes para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, nomeadamente por *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Enterobacterales* resistentes aos carbapenemos, levou à reintrodução recente de um antibiótico antigo, a colistina, como uma das opções terapêuticas de último recurso, levando à sua reclassificação por parte da Organização Mundial de Saúde (OMS) como antibiótico de importância crítica em contextos de saúde humana ¹⁹. Todavia, a colistina, tem sido amplamente utilizada em contexto de produção animal em diversos países com fins terapêuticos, profiláticos e de promoção do crescimento ^{20,21}.

Os mecanismos de resistência à colistina estavam, até 2015, relacionados com a ocorrência de mutações cromossômicas, não estando, portanto, descrita a ocorrência de fenómenos de transferência horizontal de genes. Contudo, um novo gene capaz de conferir resistência à colistina – gene *mcr-1* (do inglês *mobile colistin resistance*) – foi identificado num plasmídeo conjugativo proveniente de isolados de *Escherichia coli* de origem animal na China ²². Após a identificação do gene *mcr-1*, outros genes homólogos foram descritos pela primeira vez em diversas enterobactérias, de diversas origens, estando atualmente identificados dez genes *mcr* diferentes em 72 países espalhados pelos cinco continentes ²³⁻²⁷. Esta distribuição ubíqua dos genes *mcr* reforça a hipótese de que o uso de colistina,

provavelmente, contribuiu para a sua rápida disseminação quer em animais quer em humanos ²³.

A minimização da emergência e disseminação da resistência aos antimicrobianos tem merecido especial dedicação nos últimos anos por parte das organizações mundiais ²⁸. A OMS tem vindo, portanto, a desenvolver, implementar e monitorizar políticas no combate à resistência antimicrobiana adotando a perspectiva de Uma Só Saúde que visa uma gestão global, coordenada e intersectorial (pois envolve todos os setores da saúde pública), cujo objetivo último é a proteção da saúde humana, animal, vegetal e ambiental ^{28,29}. Assim, a gestão da resistência à colistina, seguindo esta abordagem, deverá incluir a interface homem-animal-ambiente ^{20,29}.

1.1. Estrutura e química da colistina

A colistina é um antibiótico polipeptídico pertencente à classe das polimixinas, isolado em 1947 a partir de *Paenibacillus polymyxa*, uma bactéria Gram-positiva presente nos solos, raízes de plantas e sedimentos marinhos ³⁰. A classe das polimixinas é constituída pela polimixina A, B, C, D e E, das quais apenas a colistina (polimixina E) e a polimixina B são utilizadas na prática clínica, representando assim uma das principais classes de antibióticos com atividade contra a maioria das bactérias de Gram-negativo ^{21,30}.

Estruturalmente as polimixinas são definidas como lipodecapeptídeos não ribossomais policatiónicos cíclicos ligados através de uma ligação alfa amida a uma cadeia de ácidos gordos. Caracterizam-se, portanto, por possuírem um anel heptapeptídico cíclico de aminoácidos e uma cadeia tripeptídica exocíclica lateral (formando um decapeptídeo) que se liga à fração lipídica da molécula. Na Figura 1.1 está representada a estrutura química da colistina que apenas difere da polimixina B num único aminoácido na posição 6 do anel heptapeptídico, isto é, no caso da polimixina B o aminoácido de D-leucina, presente na molécula de colistina, é substituído por uma D-fenilalanina. As posições 1,3,4,5,8 e 9 do decapeptídeo encontram-se carregadas positivamente, devido aos grupos amina livres dos resíduos de ácido 2,4- diaminobutírico (Dab), ao passo que, as posições 2 e 10 possuem o aminoácido treonina e as posições 6 e 7 contém um aminoácido de leucina, os quais, desempenham um papel fundamental na atividade bactericida da colistina ^{21,31}.

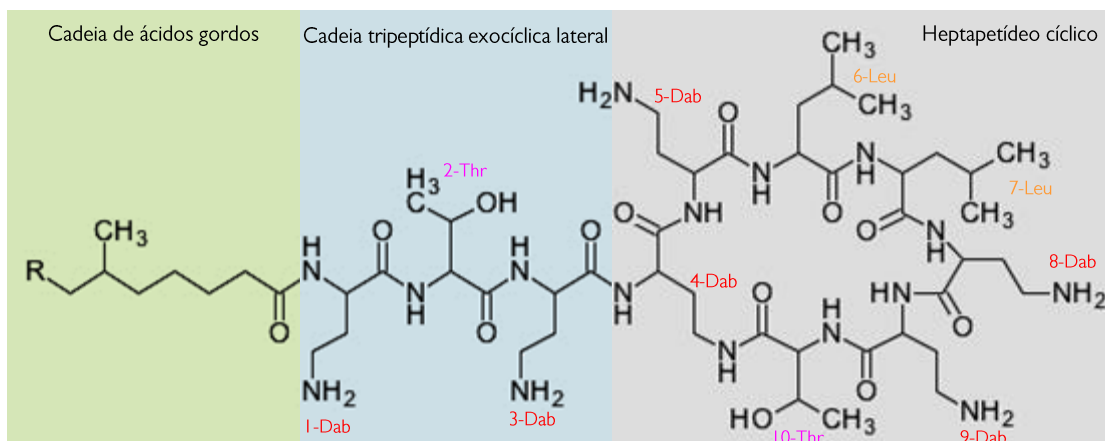


Figura 1.1. Estrutura química da colistina. A colistina é um lipodecapeptídeo constituído por heptapeptídeo cíclico (representada a cinza), e uma cadeia tripeptídica lateral (representada a azul) ligada através de uma ligação alfa amida a uma cadeia de ácidos gordos (representada a verde).

A atividade antimicrobiana das polimixinas está intrinsecamente associada à sua estrutura e interações que dela advém. Posto isto, no caso da colistina, os grupos amina livres do Dab são responsáveis pelo carácter hidrofílico de certas regiões da molécula, ao passo que o resíduo de ácido gordo é responsável pela presença de grupos lipofílicos^{21,32,33}. Além disso, a análise da estrutura tridimensional mostrou que esta molécula peptídica é enrolada de tal forma que os seus domínios polares e hidrofóbicos formam duas faces distintas, conferindo-lhe uma anfipaticidade estrutural essencial para a sua atividade antibacteriana³³.

1.2. Mecanismo de ação

O lipopolissacarídeo (LPS), principal componente da membrana externa das bactérias de Gram-negativo, que desempenha um papel essencial na estabilidade da membrana externa bacteriana e na permeabilidade celular, é o alvo inicial da colistina³³. O LPS é constituído por três domínios: o lípido A, o oligossacarídeo central e o antígeno O, sendo neste caso, o lípido A o domínio que importa destacar, uma vez que atua como âncora hidrofóbica através do empacotamento apertado das cadeias de ácido gordo cuja finalidade é a estabilização da estrutura geral da membrana externa das bactérias de Gram-negativo³⁴. Alguns catiões divalentes como Ca²⁺ e Mg²⁺ intercalam-se entre as moléculas de LPS, formando interações poliónicas promovendo a compactação do LPS assegurando assim a sua estabilização³³.

Ação bactericida da colistina inicia-se, então, através da sua ligação ao lípido A do LPS, tal como elucidado na Figura I.2 ²¹. A interação eletrostática entre os grupos amina livres do Dab, carregados positivamente e os grupos fosfato do lípido A, carregados negativamente, desencadeia uma permuta catiónica, levando à substituição dos catiões divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} por moléculas policationicas de colistina, e conseqüente alteração da estrutura do LPS ^{21,33}. A permeabilidade da membrana externa é, portanto, afetada após a inserção da colistina, essencialmente mediada pela cadeia de ácidos gordos e pelos aminoácidos de D-leucina presentes nas posições 6 e 7 do decapeptídeos, uma vez que se verifica a ocorrência de um mecanismo de auto-captção e acesso da colistina ao espaço periplasmático ³³. Deste modo, a integridade física da bicamada fosfolipídica da membrana citoplasmática é comprometida, ocorrendo a sua disrupção, com libertação do conteúdo intracelular e conseqüente morte celular ^{33,35}.

A ação antibacteriana da colistina não se esgota somente na sua potente atividade bactericida, uma vez que, esta também possui atividade anti-endotoxina, isto é, as polimixinas são capazes de se ligar ao lípido A, que corresponde à endotoxina bacteriana, aquando a sua libertação durante a lise celular, neutralizando-o, inibindo muitos dos efeitos biológicos ^{21,36}. Por outro lado, e tal como mostrado na Figura I.2, há ainda que considerar que as polimixinas inibem as NADH-quinona oxidoredutases do tipo II, enzimas essenciais na cadeia respiratória e que se encontram presentes na membrana interna das bactérias ³⁷.

Por fim, foram, posteriormente, propostos mecanismos de ação alternativos relacionados com a atividade da colistina no interior da célula. Estes destacam por um lado, a capacidade das polimixinas se ligarem, através do espaço periplasmático, às membranas interna e externa, permitindo o seu contacto (contacto vesícula-vesícula), que por sua vez leva a uma perda de especificidade de fosfolípidos de cada uma das membranas, resultando, assim, num desequilíbrio osmótico e conseqüente lise celular e por outro, a capacidade da colistina induzir a morte celular, por um mecanismo de stress oxidativo, através da produção espécies reativas de oxigénio, via Reação de Fenton. Esta reação consiste na conversão de O_2^- em H_2O_2 por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), seguida da oxidação de Fe^{2+} em Fe^{3+} e, conseqüente formação de radicais hidroxilo que induzem danos oxidativos no ADN bacteriano, proteínas e lípidos, o que tem como conseqüência última a morte celular (Figura I.2) ^{33,38}.

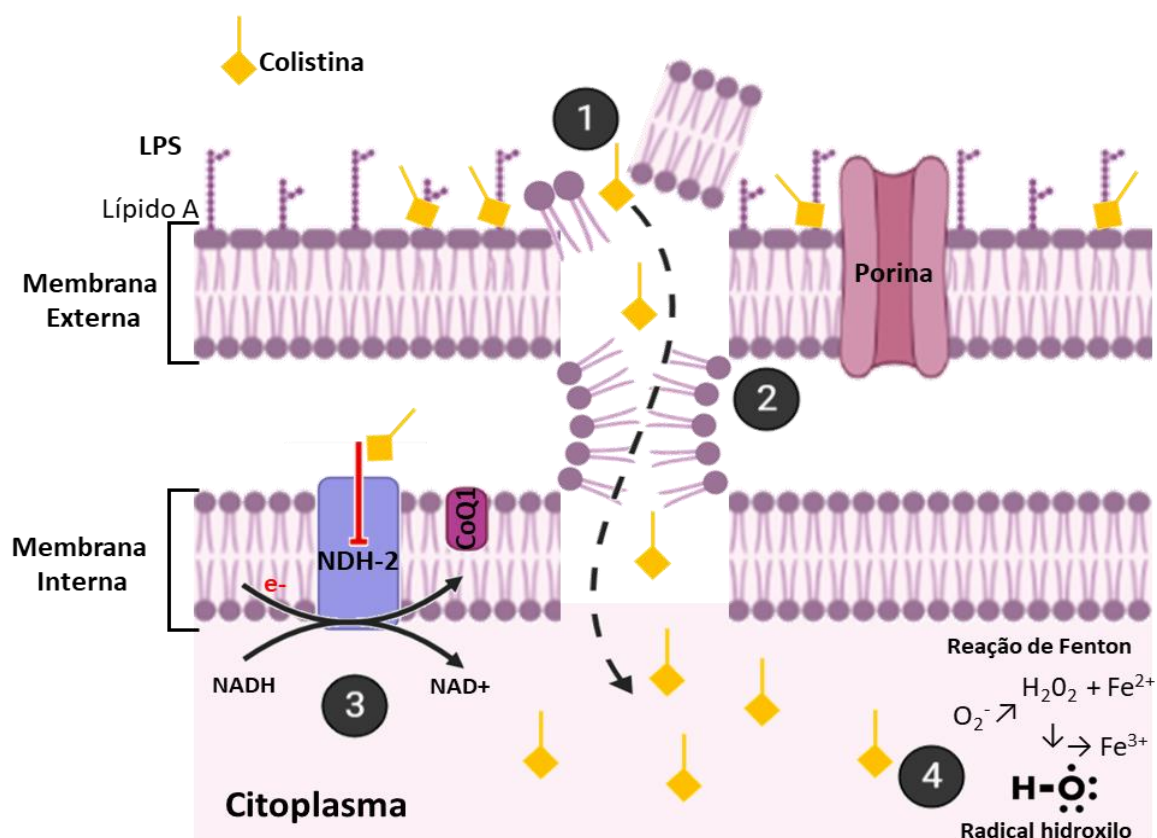


Figura 1.2. Ação da colistina na membrana celular das bactérias de Gram-negativo. ❶ A colistina liga-se diretamente ao lípido A do lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana celular externa através de interações eletrostáticas, causando a sua disrupção e consequente lise celular. ❷ Contacto vesícula-vesícula: após a passagem pela membrana externa a colistina leva à fusão do folheto interno da membrana externa com o folheto externo da membrana citoplasmática, levando à perda de fosfolípidos e morte celular. ❸ Inibição da enzima NDH-2 que se encontra presente na membrana interna das bactérias e participa na cadeia respiratória. ❹ Produção de radicais hidroxilo: a colistina induz a produção de espécies reativas de oxigénio, através da Reação de Fenton, causando danos ao nível do ADN, lípidos e proteínas, acabando por levar à morte celular.

1.3. Espectro de atividade

As polimixinas, devido à sua ligação seletiva ao LPS, possuem atividade contra a maioria dos bacilos Gram-negativo aeróbios, causando a rápida morte bacteriana através de um mecanismo dependente da concentração ³⁶. A colistina é, portanto, ativa contra a maioria dos membros da família *Enterobacteriaceae*, incluindo *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* Possui ainda atividade significativa contra bactérias de Gram-negativo não fermentadoras da lactose, tais como, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Pseudomonas aeruginosa* ³⁹. Todavia, espécies como *Morganella morganii*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Chromobacterium spp.*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas mallei*, *Burkholderia cepacia*, *Legionella*

spp., *Brucella spp.*, *Campylobacter spp.* e *Vibrio cholerae* são naturalmente resistentes às polimixinas uma vez que o seu alvo de ação, neste caso, o lípido A do LPS possui grupos 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) em substituição dos grupos fosfato. Por fim, as polimixinas não são ativas contra cocos Gram-negativos (*Neisseria spp.*), bactérias Gram-positivas, bactérias anaeróbias, fungos e parasitas.

I.4. Uso de colistina em contexto de Medicina Humana e Medicina Veterinária

I.4.1. Medicina Humana

Após a sua descoberta, a colistina foi aprovada para uso humano e, por isso, foi largamente usada na Europa e no Japão ⁴⁰. No entanto, nos anos 70 o seu uso foi reconsiderado devido à sua neuro e nefrotoxicidade após administração parenteral, acabando mesmo por deixar de ser usada nos anos 80, uma vez que surgiram novos agentes antibacterianos mais ativos e menos tóxicos, como algumas quinolonas, β -lactâmicos e alguns aminoglicosídeos que se tornaram fundamentais no tratamento de infeções causadas por bactérias de Gram-negativo ^{21,40}. Posto isto, durante largos anos o uso de colistina em humanos esteve restrito a aplicações tópicas e oftálmicas, permanecendo a via sistémica e inalatória reservada a doentes com fibrose quística ²¹. Contudo, nos últimos anos, a emergência de bactérias de Gram-negativo multirresistentes, em particular, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *Enterobacterales*, e a escassez global de novos antibióticos, levaram à reintrodução da colistina na prática clínica como última opção terapêutica contra infeções provocadas por bactérias multirresistentes, em especial as produtoras de carbapenemases ^{21,40}.

A colistina está, atualmente, aprovada sob a forma de sulfato de colistina (SC) e colistimetato de sódio (CMS), constituindo assim duas entidades químicas diferentes ^{21,41}. O SC foi o primeiro a ser utilizado na terapêutica, contudo, fruto dos efeitos nefro e neurotóxicos decorrentes da sua administração, foram conduzidos, posteriormente, alguns estudos que visavam a diminuição da sua toxicidade ⁴¹. Deste modo, modificações na estrutura molecular levaram, em 1959, à introdução de um derivado menos tóxico da colistina, o CMS, que não possui atividade antibacteriana, uma vez que a pH fisiológico é, ao contrário da colistina, um polianião, sendo por isso, considerado um pro-fármaco, que

devido à sua instabilidade *in vivo* é convertido em colistina farmacologicamente ativa através de uma reação de hidrólise ^{41,42}.

O SC poder ser administrado quer por via oral, quer por via tópica. No primeiro caso, e, uma vez que o SC não sofre absorção ao nível gastrointestinal, a sua administração é útil no tratamento de infeções intestinais devido à sua ação bactericida local. Por sua vez, a administração tópica de SC está indicada no tratamento de infeções cutâneas causadas por bacilos Gram-negativo ^{36,43,44}.

Quando se pretende uma administração por via parenteral, isto é intravenosa, intramuscular, intratecal (no caso de meningites) ou intraventricular (no caso de ventriculites) é utilizada a colistina na forma de pro-fármaco, ou seja, o CMS ⁴⁴. No entanto, a administração intramuscular é pouco utilizada na prática clínica dado que a sua absorção é variável e porque pode ser muito dolorosa ³⁶. A sua administração por via intravenosa ou intramuscular está reservada ao tratamento de infeções nosocomiais graves, pneumonias associadas à ventilação mecânica e infeções broncopulmonares em doentes com fibrose quística.

Finalmente, ambas as formas, SC e CMS podem ser administradas por via inalatória, através de aerossoloterapia, no tratamento de infeções pulmonares crónicas por *P. aeruginosa* em doentes com fibrose quística. Contudo, o uso de SC está associado a maiores taxas de broncoconstrição ^{36,41}.

Além do uso na população adulta, a colistina tem sido também usada para o tratamento de infeções por bactérias de Gram-negativo multirresistentes em pediatria, uma vez que esta se mostrou segura e eficaz, desde que monitorada a função renal do doente ^{44,45}.

Portanto, com a reintrodução da colistina na terapêutica, o seu uso, atualmente, deverá ser, apenas, considerado no tratamento de infeções causadas por bactérias de Gram-negativo resistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis, após confirmação através de testes de suscetibilidade *in vitro* adequados. Do mesmo modo, o recurso à colistina parece ser uma opção viável no tratamento de doentes com infeções causadas por bactérias de Gram-negativo com suscetibilidade, *in vitro*, a outros agentes antimicrobianos, quando o tratamento com estes agentes se revela ineficaz ³⁹.

I.4.1.1. Neurotoxicidade e nefrotoxicidade associada à colistina

A colistina é um fármaco com estreita margem terapêutica, estando assim a sua administração comumente associada a efeitos tóxicos ⁴⁶. Os efeitos adversos decorrentes da utilização da colistina na terapêutica estão mais relacionados com a administração parenteral do fármaco e traduzem-se essencialmente em nefrotoxicidade e neurotoxicidade podendo, contudo, a toxicidade pulmonar também ocorrer quando administrada por via inalatória, ainda que menos frequentemente ^{36,46}.

A nefrotoxicidade é o evento adverso mais comum e inclui, principalmente, a necrose tubular aguda manifestada através do decréscimo da *clearance* da creatinina e aumento dos níveis serológicos de ureia e creatinina, no entanto, a hematúria, proteinúria, oligúria são outras manifestações clínicas da toxicidade renal causada pelo uso de colistina ^{36,39,46}.

As taxas de incidência de nefrotoxicidade são muito variáveis devido aos diferentes critérios existentes para a definição de insuficiência renal, ao regime posológico adotado (duração e doses de colistina administradas), à administração concomitante de outros fármacos potencialmente nefrotóxicos (anti inflamatórios não esteróides, aminoglicosídeos ou vancomicina) e a fatores relacionados como o doente (idade, sexo e patologias renais associadas) ⁴⁷. No entanto, quando comparadas, as taxas de ocorrência de nefrotoxicidade de estudos mais recentes são inferiores às taxas encontradas nos estudos mais antigos. Tal facto deve-se à diminuição das impurezas químicas presentes nas formulações de CMS, a uma melhor e mais apertada monitorização de doentes nas unidades de cuidados intensivos e a não administração concomitante de outros fármacos potencialmente nefrotóxicos ^{36,39}.

Em conclusão, a nefrotoxicidade induzida pela administração de colistina envolve o seu acúmulo substancial nas células tubulares renais, stress oxidativo, indução de danos no DNA e apoptose ⁴⁶.

Apesar de menos comum que a toxicidade renal, a neurotoxicidade está, também, associada ao uso de colistina ^{46,47}. Deste modo, as manifestações clínicas da neurotoxicidade são, geralmente, menos severas, sendo a parestesia periférica e facial a mais frequente ⁴¹. Todavia, fraqueza muscular, tonturas, vertigens, alucinações, convulsões, distúrbios visuais, surdez parcial, confusão, ataxia, letargia e bloqueio neuromuscular constituem outras manifestações clínicas ^{36,39,46}. O bloqueio neuromuscular pode, por sua vez, levar a casos de insuficiência respiratória ou apneia, contudo estes fenómenos são muito raros ⁴¹.

Tanto a neurotoxicidade como a nefrotoxicidade são considerados dose dependente e geralmente reversíveis após a suspensão atempada do fármaco, existindo, contudo, relatos, ainda que escassos, de nefrotoxicidade irreversível após interrupção do tratamento ^{46,47}.

1.4.2. Medicina veterinária

Apesar do uso restrito e descontinuado em medicina humana, a colistina continuou a ser amplamente utilizada em medicina veterinária durante décadas, não só no tratamento de doenças infecciosas, mas também na sua profilaxia e metafilaxia em países asiáticos, europeus e norte americanos. No que respeita à produção industrial de animais produtores de alimento e aquacultura a colistina foi, também, usada como promotor de crescimento.

De facto, a produção animal é uma atividade extremamente dinâmica, influenciada por diversos fatores, nos quais se inclui o crescimento demográfico. Deste modo, o aumento da população tem como consequência o aumento da necessidade e procura de produtos de origem animal forçando, assim, a otimização dos sistemas de criação, nutrição e saúde animal ⁴⁸⁻⁵⁰. O uso de antibióticos com as finalidades já referidas assumiu, neste contexto de otimização da produção de animais em regime intensivo, um papel fundamental ⁵¹.

A colistina tem sido usada em diversas espécies animais, incluindo suínos, aves, bovinos, ovinos, caprinos e coelhos. Nos países pertencentes ao Espaço Económico Europeu a sua utilização em animais foi autorizada na década de 1950 e na época tinha como principais indicações o tratamento e a prevenção da diarreia em suínos causada por *E. coli* e *Salmonella* spp., o tratamento da diarreia neonatal em leitões e bezerros causada por *E. coli* bem como o tratamento da colibacilose leve em aves ^{29,44}. Não obstante, em alguns países asiáticos, onde se inclui a China, Índia, Japão e Vietname, a colistina foi também administrada como aditivo nas rações animais com a finalidade de promoção do crescimento, melhorando a eficiência alimentar e o ganho de peso corporal em animais produtores de alimento ^{23,52}. Situação semelhante aconteceu nos Estados Unidos da América (EUA), onde o uso de colistina foi aprovado pela *Food and Drug Administration* e no Brasil onde, também, a colistina foi adicionada à ração como promotor de crescimento na pecuária, principalmente em suínos e aves destinadas ao consumo humano ²³.

O uso de colistina como promotor de crescimento tornou-se, portanto, prática comum por todo o mundo. Na China, em 2015, registaram-se as maiores taxas de utilização de

colistina no setor agropecuário. Ainda assim, na Europa, em 2013, as polimixinas constituíram o quinto grupo de antimicrobianos com maior número de vendas, sendo a colistina responsável por 99,9% dessas vendas. As formulações para administração oral constituíam a grande maioria do consumo de polimixinas em animais de produção uma vez que estas formulações apresentam como vantagem o facto de poderem ser administradas oralmente na alimentação e na água ^{44,53}. Tal prática envolve, portanto, o tratamento de todos os animais de uma mesma produção, resultando na administração de colistina quer a animais doentes quer a animais saudáveis – metafilaxia ⁵⁴.

Nas aquaculturas, a colistina também tem sido usada com o intuito de prevenir as infeções causadas por bactérias de Gram-negativo.

Estão, ainda, disponíveis formulações auriculares e oftálmicas de colistina em monoterapia ou em combinação com outros agentes antimicrobianos destinadas a animais de companhia cujo uso é, praticamente, negligenciável quando comparado como os animais de produção ⁴⁴.

O uso massivo de colistina teve como consequência a emergência e disseminação de estirpes bacterianas resistentes à colistina quer comensais, quer patogénicas, presentes no trato intestinal de animais de produção. Por sua vez, estas bactérias resistentes podem colonizar a microbiota humana fluindo através da cadeia alimentar por manipulação e/ou consumo de produtos alimentares contaminados ²⁹. Aliado ao seu uso massivo, o facto de a colistina ser pouco absorvida e, portanto, possuir baixa biodisponibilidade oral torna os efeitos colaterais sistémicos decorrentes da sua exposição praticamente negligenciáveis, reforçando a emergência de resistência como resultado da pressão seletiva sobre a microbiota intestinal ^{29,53}. Por conseguinte, em 2006 a União Europeia (UE) começou a implementar restrições ao uso de colistina, proibindo a suplementação da ração animal com antibióticos com o objetivo de promoção do seu crescimento. Do mesmo modo, em 2014, começaram a ser obrigatórios testes de suscetibilidade à colistina em bactérias isoladas a partir de animais de produção através de programas de monitorização nacional. Finalmente, em 2016, a Agência Europeia do Medicamento (EMA) recomendou o uso de colistina apenas para fins de tratamento ou metafilaxia em animais produtores de alimento, proibindo o seu uso profilático estando o seu uso restrito e apenas indicado no tratamento de infeções entéricas causadas por *E. coli* não invasiva ²⁰. A abordagem da resistência à colistina segundo a perspectiva de Uma Só Saúde teve como principal foco a limitação do

seu uso em animais de produção, verificando-se assim uma quebra de 54% nas vendas de polimixinas no setor veterinário entre 2011 e 2018 ²⁹. Ainda assim, em 2020, 6 países, nos quais se inclui Portugal, mantêm consumos de polimixinas acima do limite recomendado pela EMA ⁵⁵.

Esta necessidade de preservação da eficácia da colistina para o tratamento de infeções por bactérias multirresistentes associada à sua disseminação de animais para humanos e a emergência de novos determinantes de resistência, como os genes *mcr*, teve também impacto nos órgãos de governação Chineses. Assim, em 2016, o Ministério da Agricultura Chinês proibiu o uso de colistina como promotor de crescimento na produção animal, estimando-se a retirada de mais de 8000 toneladas de colistina usadas como promotor de crescimento no setor veterinário ⁵⁶.

Finalmente, em 2019, a EMA categorizou os antibióticos utilizados em animais com o objetivo de proceder à ao seu uso prudente e responsável, com finalidade última de reduzir o risco de resistência bacteriana e potenciais consequências para a saúde pública decorrentes do seu surgimento. A tomada de decisões por parte dos médicos veterinários deverá ser apoiada nesta categorização que fundamentalmente dividiu os antibióticos passíveis de ser usados em animais em 4 categorias: A – evitar; B – restringir; C – precaução; D – prudência. As polimixinas à semelhança das cefalosporinas 3^a e 4^a geração e das quinolonas estão inseridas na categoria B, isto é, o seu uso deve, sempre que possível, basear-se em testes de suscetibilidade antimicrobiana, devendo ser apenas considerados quando não existem antibióticos clinicamente eficazes nas categorias C ou D, uma vez que os antibióticos pertencentes a esta categoria são extremamente importantes na medicina humana e a sua utilização em animais deve ser restringida de forma a mitigar os riscos para a saúde pública ⁵⁷.

1.5. Testes de suscetibilidade à colistina e *breakpoints* clínicos

Apesar de ser um antibiótico antigo, com uso clínico longo e bem documentado, o método de testagem de suscetibilidade à colistina considerado, hoje em dia, adequado foi, somente, definido recentemente. Em primeiro lugar, é importante referir que somente o SC deverá ser considerado nos testes de suscetibilidade uma vez que, o CMS é um pro-fármaco despromovido que qualquer atividade antimicrobiana e instável *in vitro* ^{21,46}.

Por outro lado, os clássicos testes de difusão em disco não devem ser considerados na determinação da suscetibilidade à colistina, uma vez que apesar de muito usados, os diâmetros das zonas de inibição obtidas através desta metodologia pouco se relacionam com os valores das concentrações mínimas inibitórias (CMI) obtidos usando o método de referência – a microdiluição em caldo (MDC) ⁴⁶. O mesmo acontece ao utilizar o método de difusão de gradiente, em que são utilizadas tiras impregnadas com um gradiente pré-definido de concentração de antibiótico, vulgarmente conhecido pelos seus nomes comerciais, E-test ou MIC test strip, que está, tal como com o método de difusão em disco, associado a falsos resultados de suscetibilidade devido à fraca difusão das polimixinas no agar ^{46,58}.

O método de referência, a MDC está, contudo, associado a algumas questões metodológicas que importa clarificar. Em primeiro lugar, a colistina liga-se ao plástico, mais especificamente ao poliestireno, devido à sua natureza anfipática. Deste modo, e para evitar que tal ligação acontecesse, foram efetuados estudos adicionando um agente surfatante como o polissorbato-80 ao sistema de teste, no entanto, o uso de agentes surfatantes não evidenciou melhorias no ensaio, sendo, portanto, recomendado o uso de microplacas de polistireno sem a adição de tensoativos ⁵⁸. Por outro lado, a concentração dos iões divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} influencia a atividade das polimixinas. Acredita-se que estes catiões interajam com a membrana externa bacteriana, afetando, conseqüentemente a interação entre as polimixinas e o lípido A. Verifica-se assim, uma aparente redução da atividade das polimixinas em concentrações mais elevadas de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Por este motivo, está preconizado na Europa pelo Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST) e nos EUA pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) o uso de Caldo Mueller-Hinton com ajuste de catiões (MHCA) para uma concentração final de 20-25 mg/L de Ca^{2+} e 10-12,5 mg/L de Mg^{2+} nos testes de suscetibilidade à polimixina B e colistina ⁴⁶.

Nos laboratórios de microbiologia clínica a MDC de é uma técnica de difícil adaptação, uma vez que é uma técnica morosa, dispendiosa, manual e requer o uso de soluções de antibiótico recém-preparadas ou congeladas (as quais acarretam erros inerentes à sua preparação), optando-se muitas vezes pelos métodos referidos anteriormente ou por dispositivos semiautomatizados, tal como Vitek2 ou Phoenix, apesar dos problemas acima mencionados ^{54,58}. Todavia, os métodos de deteção fenotípica não permitem distinguir qual o mecanismo subjacente à resistência à colistina, existindo, portanto, a necessidade de

aplicação de métodos genotípicos, após realização dos testes de suscetibilidade com o objetivo de preceder à sua identificação. A detecção genotípica baseia-se em métodos de reação em cadeia da polimerase, em inglês *polymerase chain reaction* (PCR) e sequenciação do genoma completo (WGS), do inglês *whole genome sequencing*. O WGS permite identificar todos os genes de resistência a antimicrobianos, no entanto ainda não está adaptado para a rotina laboratorial. Futuramente, este será o método mais eficaz na detecção de genes de resistência à colistina, incluindo os genes *mcr*⁵⁹. Em contrapartida, os métodos de detecção por PCR apresentam algumas limitações, em parte, devido à sua amplificação seletiva apenas da sequência-alvo conhecida. Deste modo, e em particular no caso dos genes de resistência à colistina mediada por plasmídeo, se um organismo possuir novos genes ou mutações nos genes *mcr*, o método de PCR por si só pode não ser capaz de detectar essa informação⁶⁰.

Finalmente, no que concerne à definição de *breakpoints* de suscetibilidade, verifica-se uma certa dificuldade no consenso entre o EUCAST e CLSI^{21,46}. Os primeiros *breakpoints* baseados no método de disco de difusão foram publicados em 1976 pelo CLSI, acabando por ser removidos quando a retirada da colistina da prática clínica, em 1980, devido aos seus efeitos tóxicos. Em 2010, o EUCAST estabelece os *breakpoints* da colistina para *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. devido à crescente emergência de bactérias de Gram-negativo multirresistentes⁶¹. Atualmente, não existem *breakpoints* definidos com base no diâmetro das zonas de inibição obtidas através do método de difusão em disco por nenhuma das duas organizações, uma vez que este método de avaliação de suscetibilidade não é o recomendado. Existem, portanto, *breakpoints* para CMI baseados no método de referência a MDC, no entanto estes diferem entre as duas organizações. No caso das normas do CLSI de 2022 a categoria “susceptível” foi removida e isolados de *Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp com valores de CMI ≤ 2 mg/L são considerados “intermédios” ao passo que nas normas do EUCAST de 2022 os valores de CMI que definem os *breakpoints* encontram-se entre parenteses devido à necessidade de distinguir bactérias com ou sem mecanismos de resistência adquiridos. Assim, para *Enterobacterales* e *Acinetobacter* spp. podemos encontrar como *breakpoint* CMIs de $\leq (2)$ mg/L e para *Pseudomonas* spp. $\leq (4)$ mg/L^{62,63}.

Com a descoberta dos genes *mcr* em plasmídeos transferíveis surgiu a necessidade de desenvolvimento de métodos de detecção rápidos e eficazes. Atualmente, tal como referido anteriormente, a MDC é o único método fenotípico recomendado e os métodos genotípicos, embora considerados padrão, requerem equipamento específico e complexo,

bem como, pessoal especializado. Desta forma, novos métodos de detecção fenotípica têm sido propostos, alguns deles baseados no crescimento em meios de cultura como CHROMID® Colistin R, Superpolymyxin™, CHROMagar™ COL-APSE, outros baseados no crescimento bacteriano quer na presença, quer na ausência de colistina como o teste Rapid Polymyxin NP, Colispot e predifusão em disco e ainda métodos imunoenzimáticos de detecção de isolados produtores de MCR ^{64,65}.

I.6. Mecanismos de resistência à colistina em bactérias de Gram-negativo

As bactérias possuem a incrível capacidade de desenvolver diversos mecanismos de proteção e adaptação aos estímulos ambientais adversos a que são sujeitas. Perante a exposição a agentes antimicrobianos como as polimixinas, as bactérias, acabam por desenvolver mecanismos de resistência, os quais, neste caso em específico, têm como principal objetivo impedir a interação eletrostática entre as polimixinas e o LPS ⁶⁶. Antes da década de 2000, a detecção de bactérias resistentes à colistina em ambiente clínico era um fenómeno raro, em parte devido ao seu pouco uso até à época ⁴². Contudo, a rápida emergência e disseminação de resistência à colistina verificada em *Enterobacteriales* quer de origem humana, quer de origem animal, dificilmente poderia ser justificada somente por mecanismos codificados cromossomicamente (genes *phoPQ*, *pmrAB*, and *mgrB*), os quais não são, geralmente, transferidos horizontalmente entre bactérias ^{29,67}. Este crescimento abrupto de bactérias resistentes à colistina, principalmente no continente asiático, levou à descoberta do gene *mcr-I* ⁶⁷.

A resistência à colistina pode ser explicada por diversos mecanismos, embora variem conforme a espécie bacteriana, traduzem-se, essencialmente, na perda total do LPS ou em modificações covalentes do lípido A do LPS, quer através da adição de grupos fosfoetanolamina (pEtN) e 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) quer através da desacilação mediada por *pagL* e hidroxilação, tal como esquematizado na Figura 1.3 ^{46,66}.

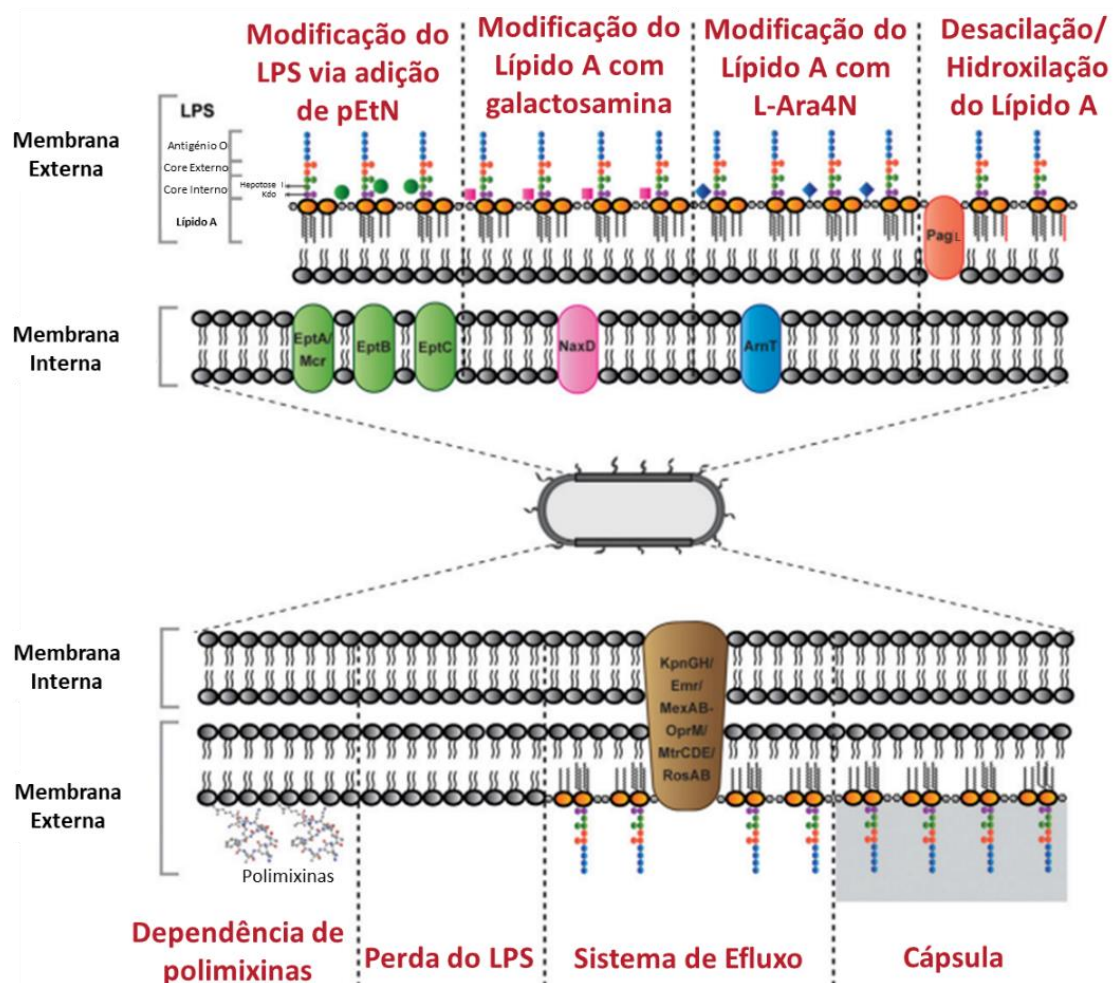


Figura 1.3. Mecanismos de resistência às polimixinas em bactérias de Gram-negativo: perda total ou modificações do Lipídeo A do LPS através da adição de grupos fosfoetanolamina (pEtN), 4-amino-4-desoxi-L-arabina (L-Ara4N), galactosamina e palmitoilação. Outros mecanismos incluem a formação de cápsula, utilização de sistemas de efluxo ou crescimento dependente de polimixinas. Adaptado de ⁴⁶.

A substituição catiônica dos grupos fosfato, que conferem carga negativa ao LPS, por L-Ara4N é, não só a mais comum, mas também a mais eficaz uma vez que o lípido A adquire carga nula ao passo que na substituição catiônica por pEtN, verifica-se a diminuição da carga de -1,5 para -1, o que por sua vez se traduz no desenvolvimento de resistência antibacteriana, uma vez que a redução da afinidade da colistina impede a sua ligação à superfície bacteriana e a sua entrada no interior da célula, onde, por sua vez, deveria exercer a sua atividade bactericida ⁶⁶. Outros mecanismos de resistência incluem a formação de cápsula, utilização de bombas de efluxo ou crescimento dependente de polimixinas (Figura 3) ^{46,68}. Nenhum mecanismo de inativação enzimática da colistina foi, ainda, descrito, a não ser em isolados de *P. polymyxa* que produzem uma enzima capaz de hidrolisar a colistina, a colistinase, através da clivagem da ligação peptídica entre a cadeia

tripeptídica lateral e o anel heptapeptídico ⁶⁹. Além disso, verifica-se a existência de resistência cruzada entre a colistina e a polimixina B ^{32,70}.

1.6.1. Resistência intrínseca à colistina

Tal como referido anteriormente, a resistência à colistina é um fenómeno que ocorre naturalmente em *S. marcescens*, *B. cepacia*, *Proteus mirabilis* e *Chromobacterium violaceum* devido à expressão do gene *eptB* e ao operão *arnBCADTEF*, os quais são responsáveis pela adição dos grupos catónicos pEtN e L-Ara4N ao LPS, respectivamente, aumentando a sua carga catiónica o que leva à diminuição da capacidade de ligação da colistina, resultando assim, na resistência intrínseca destas espécies à colistina. ^{66,71}. No caso de *Proteus mirabilis* o lípido A do LPS contém, normalmente, L-Ara4N tornando esta espécie intrínseca e naturalmente resistente às polimixinas. Estas modificações no LPS em *P. mirabilis* estão relacionadas com diferentes genes. O gene *eptC* catalisa a adição de pEtN, ao passo que a adição de L-Ara4N ao LPS é mediada pelo gene *galU* e pelo sistema de dois componentes *rppA/rppB*, capaz de ativar o operão *arnBCADTEF*. A inativação de qualquer um destes genes ou mutações que levem à ausência de L-Ara4N no LPS resultam num fenótipo de suscetibilidade às polimixinas. O operão *arnBCADTEF* está, igualmente, descrito em *Morganella morganii* e *Serratia marcescens*, o que torna ainda mais evidente o envolvimento deste operão na resistência intrínseca às polimixinas ⁶⁶. Todas as bactérias Gram-positivas são também intrinsecamente resistentes às polimixinas, uma vez que não possuem membrana externa ⁶⁰.

1.6.2. Mecanismos de resistência adquirida à colistina de origem cromossómica em *Enterobacteriales*

A resistência adquirida às polimixinas em espécies naturalmente suscetíveis é geralmente resultado de modificações da superfície celular bacteriana, nas quais se incluem uma vez mais, alterações na estrutura do LPS, alterações estas que podem ser codificadas cromossomicamente ou através de plasmídeos ⁶⁷. Além disso, outros mecanismos de resistência identificados incluem a produção e libertação de polissacarídeos capsulares, que bloqueiam ou ligam-se às polimixinas, como acontece em alguns isolados de *K. pneumoniae*. Apesar de descritos em algumas bactérias de Gram-negativo como *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp. e *K. pneumoniae*, estes mecanismos permanecem ainda desconhecidos para

outras espécies bacterianas ^{29,60,67}. À semelhança do que acontece nas bactérias naturalmente resistentes à colistina, estão identificados diversos operões e genes, codificados cromossomicamente e relacionados com a adição de grupos catiónicos pEtN e L-Ara4N ao LPS, tal como esquematizado na Figura 1.4 e sumarizado na Tabela 1.1.

1.6.2.1. Sistemas de dois componentes PmrAB, PhoPQ e CrrAB e sua regulação através do gene *mgrB*

Os sistemas de dois componentes PhoPQ e PmrAB são responsáveis pela adição dos grupos catiónicos ao LPS, ao passo que as enzimas que codificam os operões são responsáveis por modificações nos genes *pmrC*, *pmrE* e nos genes reguladores do operão *arnBCDADTEF* (também conhecido por *pmrHFIJKLM*) ⁶⁶. As proteínas PhoQ e PmrB possuem atividade tirosina cinase e são responsáveis pela fosforilação das proteínas reguladoras PhoP e PmrA. Para além disso, o gene *mgrB* controla negativamente a expressão do sistema de dois componentes PhoPQ (Figura 1.4). No que respeita à síntese e adição de L-Ara4N ao LPS, esta ocorre pela ativação da expressão génica de *arnBCDADTEF* e *pmrE* ^{66,72}.

O operão *pmrCAB* codifica três proteínas: a proteína PmrA reguladora de pEtN; proteína cinase PmrB ligada à membrana citoplasmática; e fosfotransferase PmrC ⁷²⁻⁷⁴. O sistema de dois componentes PmrAB é ativado por diversos estímulos, como baixo pH, elevada concentração de ião férrico Fe³⁺, exposição ao alumínio (Al³⁺) e presença de peptídeos antimicrobianos catiónicos ^{72,74}. Assim, a proteína PmrB é responsável pela ativação de PmrA por fosforilação, que por sua vez ativa a regulação dos operões *pmrCAB* e *arnBCDADTEF* e o gene *pmrC* ou *pmrE*, resultando na adição de pEtN e L-Ara4N, respetivamente, ao lípido A do LPS (Figura 1.4) ^{72,75}. Mutações ao nível dos genes *pmrA/pmrb* resultam numa indução dos operões *pmrCAB* e *arnBCDADTEF* e do gene *pmrE* e *pmrC*, levando à resistência à colistina tal como descrito em *K. pneumoniae* ⁷⁶, *S. enterica* ⁷⁷, *Enterobacter aerogenes* ⁷⁸ e *E. coli* ²⁹. Por sua vez, o sistema de dois componentes PhoPQ constituído pela proteína reguladora PhoP e pela proteína PhoQ com atividade cinase, é ativado e protege a bactéria de baixas concentrações de cálcio e magnésio, baixo pH e da presença de peptídeos antimicrobianos catiónicos ^{74,75}. A ativação deste sistema resulta na modificação do lípido A através de duas vias. Primeiro, a proteína PhoP é fosforilada por PhoQ que por sua vez, ativa a transcrição do operão *arnBCDADTEF*, levando à modificação

do lípido A através da adição de L-Ara4N. Segundo, a proteína PhoP é indiretamente responsável, através da proteína conectora PmrD, pela ativação da proteína PmrA, que subsequentemente ativa a transcrição do operão *anrBCDADTEF* e a síntese de pEtN, o qual é transferido para o lípido A (Figura 1.4) ^{74,79,80}. Finalmente, está ainda descrito que em *S. enterica* a ativação de PhoP desencadeia a ativação de PagL que medeia a desacilação do lípido A. Mutações nos genes *phoP/Q* que levam à expressão constitutiva deste sistema estão identificadas em *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. enterica* estão relacionadas com a resistência adquirida à colistina ^{66,81,82}.

O gene *mgrB*, também representado na Figura 1.4, codifica uma proteína transmembranar responsável pela regulação dos sistemas de dois componentes PmrAB e PhoPQ. Esta regulação é conseguida através de um mecanismo de *feedback* negativo, no qual é inibida a atividade cinase da proteína PhoQ ⁸³⁻⁸⁵. Porém, a inativação ou a ocorrência de mutações no gene *mgrB* resulta na sobre-expressão do operão PhoPQ e consequente ativação do operão *arnDCDTEF*, levando à produção excessiva de L-Ara-4N e sua posterior adição ao LPS ^{84,86}. Estão, já, identificadas várias mutações que consistem na substituição de aminoácidos na proteína MgrB, ou até mesmo na sua deleção completa, resultando num fenótipo de resistência à colistina em bactérias de Gram-negativo, em particular em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli* ^{83,86}.

Tabela 1.1. Resistência adquirida à colistina: determinantes de resistência e mecanismo associado em alguns dos membros da família *Enterobacteriaceae*.

Espécie	Determinante/ Gene	Mecanismo de resistência	Ref.
<i>E. coli</i>	<i>pmrA/pmrB</i>	Modificação do lípido A por ativação do operão <i>arnBCADTEF</i> e genes <i>pmrC</i> e <i>pmrE</i>	66,89,90
	<i>phoP/phoQ</i>	Modificação do lípido A por ativação do operão <i>arnBCADTEF</i> e <i>pmrAB</i> por <i>pmrD</i>	91
	<i>arnBCADTEF</i>	Modificação do lípido A por adição de L-4AraN	21
	<i>mgrB</i>	Sobre-expressão de <i>phoPQ</i> e activação do operão <i>arnBCADTEF</i>	83,91
	<i>acrAB</i>	Bomba de efluxo	92
	<i>lpxM</i>	Modificação do lípido A por adição de L-4AraN	66
	<i>pmrC/E</i>	Modificação do lípido A por adição de pEtN	29,93
	<i>mcr-I a -9</i>	Fosfoetanolamina transferase	94,95
<i>S. enterica</i>	<i>arnBCADTEF</i>	Modificação do lípido A por adição de L-4AraN	20,66
	<i>pmrA/pmrB</i>	Modificação do lípido A por ativação do operão <i>arnBCADTEF</i> e genes <i>pmrC</i> e <i>pmrE</i>	90,96,97
	<i>phoP/phoQ</i>	Modificação do lípido A por ativação do operão <i>arnBCADTEF</i> e <i>pmrAB</i> por <i>pmrD</i>	21,66
	<i>PagL</i>	Desacilação do lípido A	66,98
	<i>lpxM</i>	Modificação do lípido A por adição de L-4AraN	66
	<i>pmrC/E</i>	Modificação do lípido A por adição de pEtN	29,99
		<i>mcr-I,-2,-3,-4,-5 e -9</i>	Fosfoetanolamina transferase
<i>K. pneumoniae</i>	<i>pmrA/pmrB</i>	Modificação do lípido A por ativação do operão <i>arnBCADTEF</i> e genes <i>pmrC</i> e <i>pmrE</i>	76,86,87
	<i>phoP/phoQ</i>	Modificação do lípido A por ativação do operão <i>arnBCADTEF</i> e <i>pmrAB</i> por <i>pmrD</i>	79,83,86,87
	<i>arnBCADTEF</i>	Modificação do lípido A por adição de L-4AraN	21,83
	<i>mgrB</i>	Sobre-expressão de <i>phoPQ</i> e activação do operão <i>arnBCADTEF</i>	84,85,101
	<i>crrB</i>	Ativação da glicosiltransferase; sobre-expressão de <i>pmrAB</i>	88
	<i>ramA</i>	Modulação da biossíntese do lípido A	102
	<i>acrAB; KpnEF</i>	Bombas de efluxo	87,103,104
	<i>lpxM</i>	Modificação do lípido A por adição de L-4AraN	66
	<i>pmrC/E</i>	Modificação do lípido A por adição de pEtN	76,105
		<i>mcr-I,-3,-7 e -8</i>	Fosfoetanolamina transferase
<i>Enterobacter spp.</i>	<i>pmrA/pmrB</i>	Modificação do lípido A por ativação do operão <i>arnBCADTEF</i>	78
	<i>phoP/phoQ</i>	Modificação do lípido A por ativação do operão <i>arnBCADTEF</i>	107
	<i>arnBCADTEF</i>	Modificação do lípido A por adição de L-4AraN	108
	<i>pmrC</i>	Modificação do lípido A por adição de pEtN	107
		<i>mcr-I,-4,-5,-8,-9 e -10</i>	Fosfoetanolamina transferase
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>mcr-I e -9</i>	Fosfoetanolamina transferase	113,114

1.6.2.2. Mutação nos genes cromoss micos responsáveis pela biossíntese do LPS – ramA, lpxA, lpxC, lpxD e lpxM

A expressão g nica relacionada com a biossíntese do LPS em *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp.   modulada pelo gene *ramA* que consiste em três subgenes: *ramA*, *romA* e *ramR*, em que os genes *ramA* e *romA* são regulados negativamente por *ramR* (repressor) ^{102,115}. Deste modo, o aumento da expressão dos genes *ramA* resulta na modifica o do LPS, o que conseqüentemente leva   resistência   colistina ¹⁰². Vários outros genes estão implicados na biossíntese do lípido A, nos quais se incluem os genes *lpxA*, *lpxC*, *lpxD*, *lpxB*, *lpxK*, *lpxL*, *lpxM* e *lpxO* ¹¹⁵. Muta es nos genes *lpxA*, *lpxC* e *lpxD* causam a perda total do LPS em *A. baumannii* resultando na resistência   colistina em *A. baumannii* ¹¹⁶, ao passo que muta es no gene *lpxM* estão associadas ao aumento da acila o do lípido A, facilitando a sua modifica o posterior através da adi o de L-Ara4N em *E. coli*, *S. enterica* e *K. pneumoniae* ⁶⁶.

1.6.2.3. O papel da cápsula e das bombas de efluxo na resistência   colistina

A superprodu o e deposi o de polissacarídeos capsulares (PSC) ani nicos impede que as polimixinas cati nicas, incluindo a colistina, atinjam o seu alvo na membrana externa bacteriana ²⁹. O número de camadas que constituem a cápsula bacteriana está diretamente relacionado com o nível de resistência, isto  , bactérias com várias camadas de PSC, como *K. pneumoniae*, são mais resistentes   colistina que aquelas com menos camadas ¹¹⁷. Além disso, a expressão não regulada da síntese de PSC em *K. pneumoniae*   responsável pelo aumento da resistência   colistina, pois verifica-se a diminui o da sua intera o eletrostática com o lípido A ¹¹⁸. Por outro lado, estão descritos algumas proteínas membranares cuja fun o   a regula o da forma o de cápsula, como por exemplo: Cpx (expressão de pilus conjugativo) e Rcs (regulador da síntese de cápsula), os quais por sua vez estão envolvidos na ativa o da bomba de efluxo KpnEF e sistema PhoPQ, respetivamente ^{119,120}. Finalmente, o gene *ugd* está envolvido na biossíntese e montagem de PSC e L-Ara4N e como tal, está também, envolvido na resistência   colistina ^{121,122}.

Alguns estudos sugerem ainda o envolvimento de bombas de efluxo na resistência   colistina ¹²³. Bombas de efluxo como KpnEF, AcrAB e proteínas Sap estão descritas em *Enterobacteriales* e a sua ativa o está associada ao aumento da resistência   colistina ^{103,123}.

A bomba de efluxo KpnEF faz parte do sistema de regulação Cpx e está associada a resistência não só à colistina, mas também rifampicina, ceftriaxona e eritromicina. Mutações nesta bomba de efluxo, normalmente implicam maior suscetibilidade à colistina, de tal modo que é estimada a redução do valor da CMI em duas vezes ¹⁰³. Por outro lado, na bomba de efluxo AcrAB, que é parte do complexo AcrAB-TolC, um sistema responsável pelo efluxo de diversos antimicrobianos, estão descritas mutações em *E. coli* que levam ao aumento da suscetibilidade à colistina em cerca de 8 vezes ¹²⁴. O envolvimento das bombas de efluxo na resistência à colistina é, também, evidenciado com o uso de inibidores das bombas de efluxo, uma vez que se observa uma redução da CMI em isolados resistentes à colistina ¹²³.

1.6.3. Resistência à colistina mediada por plasmídeo: breve caracterização genética do gene *mcr-1*

Inicialmente identificado na China em 2015, e posteriormente, em África, Europa e América, o gene *mcr-1*, responsável pela resistência à colistina mediada por plasmídeo, foi descrito em isolados de *E. coli* de origem animal, no decorrer de um programa de monitorização da resistência antimicrobiana ^{22,23}. O rápido aumento da resistência à colistina evidenciado durante este programa levou ao estudo mais aprofundado destas estirpes, e, uma vez que, os mecanismos cromossómicos dificilmente seriam responsáveis por esta rápida emergência, foi colocada a hipótese desta resistência estar codificada num plasmídeo ^{20,22}. Assim, o gene *mcr-1* foi identificado num plasmídeo conjugativo do tipo IncI2, após a sua sequenciação completa, tal como mostrado na Tabela 1.2 ²².

O gene *mcr-1* codifica uma fosfoetanolamina transferase, enzima que catalisa a adição de grupos pEtN ao lípido A do LPS, de modo similar aos mecanismos codificados cromossomicamente descritos anteriormente, tal como esquematizado na Figura 1.4 ²². A expressão destes genes é capaz de induzir resistência à colistina em diferentes espécies bacterianas, em particular em enterobactérias, tal como sumarizado na Tabela 1.1, sem que estas apresentem qualquer outro tipo de mecanismo de resistência associado às polimixinas ²¹. Os iões zinco são essenciais para o funcionamento da enzima MCR-1, embora os locais de ligação biológicos do zinco não estejam totalmente identificados ¹²⁵.

A descoberta deste gene foi, e é objeto de grande preocupação global, essencialmente porque, a colistina é, atualmente, considerada terapêutica de última linha no tratamento de infeções por bactérias multirresistentes e, por outro lado, porque este gene foi encontrado,

não só em isolados de diferentes espécies bacterianas provenientes de animais de produção, mas também, em isolados clínicos provenientes de habitantes da mesma área geográfica onde foi pela primeira vez detetado, evidenciando, assim, a sua capacidade de disseminação através de mecanismos de transferência horizontal de genes ²².

Após a sua descoberta, e, através de vários programas de monitorização e avaliação da resistência antimicrobiana, que foram instituídos desde então, foram descritos pela primeira vez vários genes homólogos ao gene *mcr-1*, codificados em diferentes tipos de plasmídeos, ubiquamente distribuídos por cinco dos sete continentes, em diferentes espécies bacterianas, provenientes de diversas fontes, tal como mostrado na Tabela 1.2. Atualmente, estão identificadas 10 famílias de genes *mcr* com mais de 100 variantes descritas e depositadas no GenBank, tendo sido proposta a sua nomenclatura em 2018 ¹²⁶. Através da Tabela 1.2 é possível constatar que o gene *mcr-3* é o que apresenta maior número de variantes, seguido do *mcr-1*, com 41 e 36 variantes descritas até ao momento, respetivamente. Os genes *mcr-2* e *-4* apresentam, respetivamente, oito e 7 variantes; os genes *mcr-8* e *-10* apresentam cinco variantes e nos genes *mcr-5* e *-9* estão descritas 4 variantes. Finalmente, apenas uma variante está descrita para os genes *mcr-6* e *-7*.

Baseado nestes estudos de vigilância epidemiológica, é defendida a hipótese de o gene *mcr-1* ter, inicialmente, surgido em animais, particularmente em suínos e bovinos, e posteriormente se tenha disseminado para humanos. Tal hipótese é sustentada no facto de o número de isolados provenientes de humanos ser consideravelmente inferior quando comparado com os isolados obtidos a partir de animais e no facto de a colistina ter sido amplamente usada em animais ¹²⁷. Além disso, importa ainda realçar que *E. coli* parece constituir o principal reservatório destes genes, quer os isolados sejam de origem animal, humana ou ambiental, e sua a disseminação e ampla distribuição por todo o mundo começou muito antes da sua primeira deteção e identificação, muito provavelmente devido à sua localização em plasmídeos conjugativos, tal como mostrado na Tabela 1.2 ^{23,127}.

Os genes *mcr*, tal como referido anteriormente, têm sido identificados numa grande variedade de plasmídeos, como IncI2, IncX, IncP, IncN, IncFII e IncHI2, embora alguns sejam mais prevalentes em determinadas regiões geográficas que outros, a distribuição ubíqua destes genes é, em grande parte, devida à mobilização de diferentes tipos de plasmídeos ²⁶.

Tabela 1.2. Identificação dos primeiros genes *mcr-1* a *-10*. Espécie bacteriana, origem, data de isolamento e detecção, tipo de plasmídeo e variantes descritas até ao momento dos primeiros genes *mcr* identificados.

Gene	Espécie	Fonte do Isolado	País	Ano de detecção	Ano de isolamento	Plasmídeo	Variantes descritas	Ref.
<i>mcr-1</i>	<i>Escherichia coli</i>	Suíno	China	2015	2011-2014	IncI2	<i>mcr-1.1</i> - <i>mcr-1.36</i>	22
<i>mcr-2</i>	<i>Escherichia coli</i>	Suíno Bovino	Bélgica	2016	2011-2012	IncX4	<i>mcr-2.1</i> - <i>mcr-2.8</i>	128
<i>mcr-3</i>	<i>Escherichia coli</i>	Suíno	China	2015	2015	IncHI2	<i>mcr-3.1</i> - <i>mcr-3.41</i>	129
<i>mcr-4</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurim	Suíno	Itália	2016	2013	ColE ₁₀	<i>mcr-4.1</i> - <i>mcr-4.7</i>	130
<i>mcr-5</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Paratyphy B	Aves de capoeira	Alemanha	2017	2011-2013	ColE	<i>mcr-5.1</i> - <i>mcr-5.4</i>	131
<i>mcr-6</i>	<i>Moraxella pluranimalium</i>	Suíno	Grã-Bretanha	2017	2014-2015	*	<i>mcr-6.1</i>	132
<i>mcr-7</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Frango	China	2017	2010-2015	IncI2	<i>mcr-7.1</i>	106
<i>mcr-8</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Suíno	China	2018	2015-2017	IncFII	<i>mcr-8.1</i> - <i>mcr-8.5</i>	25
<i>mcr-9</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Homem	USA	2019	2010	IncHI2	<i>mcr-9.1</i> - <i>mcr-9.4</i>	133
<i>mcr-10</i>	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	Homem	China	2019	2016	IncFIA	<i>mcr-10.1</i> - <i>mcr-10.5</i>	109

* = Localizado no cromossoma

O gene *mcr-1* é, frequentemente, identificado associado à sequência de inserção IS*ApI1*, a qual parece desempenhar um papel importante na sua mobilização e disseminação. A sequência de inserção IS*ApI1* é um elemento genético móvel, pertencente à família IS30 e foi identificado pela primeira vez em *Actinobacillus pleuropneumoniae*, um bacilo Gram-negativo pertencente à família *Pasteurellaceae* e agente etiológico da pleuropneumonia fibrinosa em suínos¹³⁴. Esta sequência de inserção codifica uma transposase, e normalmente está localizada a montante e/ou a jusante do gene *mcr-1*, podendo, então, desempenhar um papel fundamental na sua translocação para o plasmídeo, tal como representado na Figura 1.5¹³⁴⁻¹³⁷.

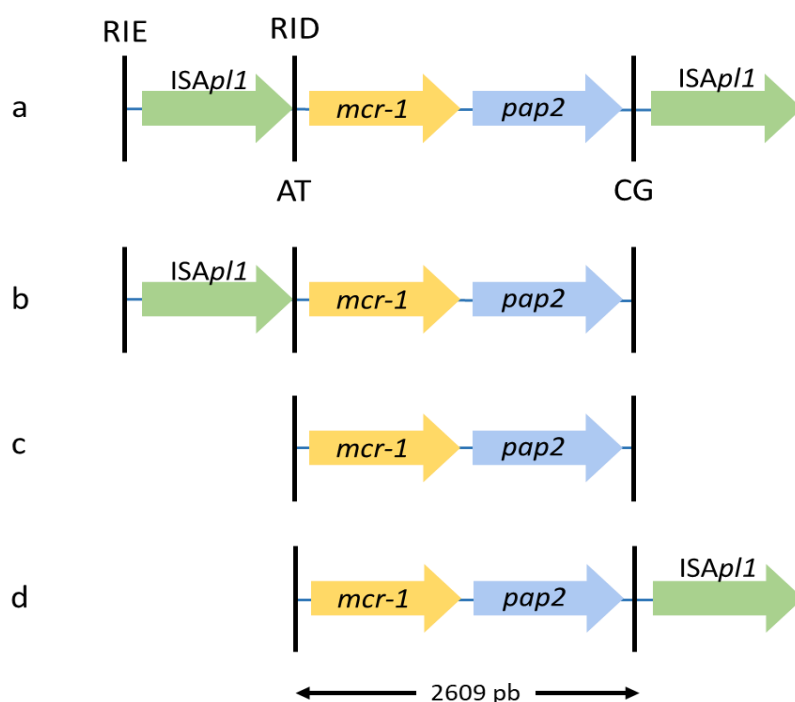


Figura 1.5. Ambiente genético do gene *mcr-1*. O gene *mcr-1* é mobilizado pela *ISApII* presente no transposão composto *Tn6330*. As setas indicam a direção de transcrição. As abreviações RIE e RID significam, respectivamente, repetição invertida à esquerda e repetição invertida à direita. Os dinucleotídeos conservados e adjacentes às cópias localizados a montante (AT) e jusante (CG) da sequência *ISApII* estão também representados. (a) Estrutura completa do transposão composto com duas cópias de *ISApII* (*Tn6330*). (b) Estrutura apenas com uma cópia de *ISApII* a montante do gene *mcr-1*. (c) Estrutura sem ambas as cópias do *ISApII*. (d) Estrutura apenas com uma cópia de *ISApII* a jusante do gene *mcr-1*. As estruturas estão representadas por ordem cronológica de identificação.

Esta organização e envolvimento da sequência *ISApII* na mobilização do gene *mcr-1* está patente em vários exemplos descritos na literatura, nos quais se inclui a primeira identificação e caracterização do gene *mcr-1*²². Assim, por exemplo, um transposão composto *Tn6330*, constituído pelo gene *mcr-1* localizado entre duas cópias da sequência *ISApII* foi descrito num clone ST57 de *E. coli* isolado a partir de galinhas¹³⁸. Outro estudo recente revelou que uma elevada percentagem de isolados de *E. coli* provenientes de frangos eram simultaneamente portadores de *mcr-1* e *ISApII*¹³⁹. A transposição de *ISApII* está também descrita em plasmídeos do tipo IncHI2, IncI2, IncP e IncX4^{135,140,141}. Contudo em alguns estudos o gene *mcr-1* está associado apenas a uma cópia de *ISApII* na sua extremidade 5' ao passo que noutros estudos se verifica a sua total ausência (Figura 1.5b, 1.5c e 1.5d)¹³⁶. Tal facto pode ser explicado com base na capacidade de excisão de uma cópia da sequência de inserção por transposição ou por eventos de recombinação não

homóloga (ligação de extremidades não homólogas), após a transposição do transposão composto original. Tais fenômenos têm como finalidade a estabilização da estrutura genética após a sua integração ^{136,142}.

A perda de elementos IS*A ϕ 11* tem como consequência a perda da sua capacidade de transposição, levando subsequentemente à estabilização do gene *mcr-1* em plasmídeos, o que facilita a disseminação generalizada do gene de resistência à colistina através de plasmídeos auto-transferíveis ²⁷.

Acredita-se que o gene *mcr-1* foi, inicialmente, mobilizado por duas cópias de IS*A ϕ 11*, tal como esquematizado na Figura 1.5, a partir de um ancestral, acabando por atingir uma ampla diversidade de plasmídeos, os quais posteriormente foram transferidos para *Enterobacteriales*, com a consequente expressão de resistência à colistina. A evidência científica atual aponta para que o gene *mcr-1* se tenha originado em espécies de *Moraxella*, um patógeno animal e potencial fonte de genes tipo-*mcr* e elementos IS*A ϕ 11*, uma vez que a região que abrange o gene *mcr-1*, um segmento de ADN com 2609 pares de base, que codifica o gene *mcr-1* e uma proteína da superfamília PAP2 apresenta 96,6% de homologia com uma região do cromossoma de *Moraxella* sp. MSG13-C03, tal como representado na Figura 1.5 ¹³⁶.

Embora o contexto genético dos diferentes alelos desta família de genes possa ser diferente do gene *mcr-1*, uma vez que, por exemplo, o gene *mcr-2* está associado a uma sequência de inserção do tipo ISEc69, os genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9*, e *mcr-10*, atualmente identificados, são todos semelhantes entre si, homólogos, e têm também em comum o facto de conferirem resistência à colistina sob o mesmo mecanismo – adição de grupos pEtN ao lípido A do LPS através da enzima fosfoetanolamina transferase ^{26,126}.

1.7. Epidemiologia dos genes de resistência à colistina mediada por plasmídeo

A identificação do primeiro gene de resistência à colistina, o gene *mcr-1*, em 2015, desencadeou uma série de estudos epidemiológicos, levando subsequentemente à descoberta de novos genes da família *mcr* e de novas variantes, colocando em causa a eficácia clínica da colistina no tratamento de infeções por bactérias multirresistentes ²⁶.

Com exceção do gene *mcr-6*, que foi encontrado pela primeira vez no cromossoma de *Moraxella pluranimalium*¹³², todos os outros genes *mcr* foram encontrados em plasmídeos conjugativos ou plasmídeos do tipo ColE mobilizáveis com plasmídeos auxiliares, tal como mostrado na Tabela 1.2^{22,25,106,109,128-131,133}. A facilidade com que os genes da família *mcr* são transferidos horizontalmente permitiu a sua disseminação por todo o mundo, levando à emergência de uma grande variedade de espécies bacterianas com maior tolerância à colistina⁹⁴.

Os genes *mcr* estão bem disseminados em *Enterobacteriaceae*, sendo frequentemente identificados, por ordem decrescente em *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Salmonella* spp., e menos em outras espécies de *Enterobacteriaceae* como *Cronobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Kluyvera* spp., *Leclercia* spp., *Raoultella ornithinolytica* e *Shigella* spp²⁷.

Em termos de distribuição geográfica, os genes *mcr-1* e *mcr-9* estão amplamente disseminados, isto é, têm sido detetados num maior número de países, seguidos dos genes *mcr-3* e *mcr-5*. Relativamente aos genes *mcr-2*, *mcr-4*, *mcr-7*, *mcr-8* e *mcr-10*, estes possuem uma distribuição mais restrita, ao passo que o gene *mcr-6* apenas foi detetado no Reino Unido^{132,143}.

Entre os cerca de 70 países em que os genes *mcr* foram detetados, em países como a China foram detetados oito genes pertencentes a esta família (todos, exceto *mcr-2* e *mcr-6*), na Tailândia foram detetados seis, enquanto que em outros países como Turquia, EUA, Nigéria, França, Espanha, Japão, Itália, Coreia, República Checa, Bélgica, Brasil, Bangladesh, Inglaterra e Camboja para além do gene *mcr-1*, mais três ou quatro genes *mcr* foram detetados²⁷.

Vários clones de *E. coli*, como ST10, ST43, ST101, ST206, ST410 e ST744 têm sido implicados na disseminação global destes genes, especialmente o clone ST10, uma vez que têm sido identificados em isolados obtidos de alimentos, animais, humanos e do ambiente. Estes clones são geralmente encontrados em simultaneamente em isolados obtidos a partir de animais e humanos²⁷. Em *S. Typhimurium* o clone ST34, globalmente disseminado, tem sido, também, isolado em animais e humanos.

Em Portugal, o gene *mcr-1* tem sido identificado em amostras biológicas de origem animal, nomeadamente de animais produtores de alimentos, como suínos, galinhas e bovinos, mas também vegetais^{26,144}. O gene *mcr-1* foi detetado em estirpes de *E. coli*, *K.*

pneumoniae, *E. cloacae* e *S. enterica* ^{26,145}. Recentemente, os genes *mcr-1* e *mcr-4* foram, simultaneamente, detetados em isolados de *E. coli* obtidos de uma exploração de suínos onde a colistina foi usada para tratamento da diarreia neonatal ¹⁴⁶.

1.8. Disseminação de genes *mcr*: Transferência Horizontal de Genes

Em contraste com a transferência vertical de genes, que ocorre quando um organismo recebe material genético do seu antecessor, a transferência lateral ou horizontal de genes (THG) resulta na transferência de informação genética entre microrganismos da mesma geração, geneticamente relacionados ou não ¹⁴⁷. Existem três mecanismos principais de THG conhecidos em bactérias: conjugação, transformação natural e transdução, que envolvem plasmídeos, ADN livre e bacteriófagos, respectivamente (Figura 1.6). Além disso, os elementos genéticos móveis (EGMs), como integrões, sequências de inserção e transposões, também desempenham um papel sinérgico na disseminação da resistência ^{148,149}.

A THG é o processo pelo qual a maioria das bactérias adquire genes de outras espécies, incluindo genes que conferem resistência aos antibióticos ¹⁵⁰. Assim, a troca de material genético é possível quando ocorre a morte celular, ou quando células vivas o libertam controladamente no meio ou em células adjacentes ¹⁴⁹. Os diferentes genes adquiridos pela célula recetora podem desencadear diferentes efeitos no seu genoma, desde efeitos deletérios, no caso de aquisição de um gene menos vantajoso, efeitos neutros, cuja sua expressão e manutenção numa população dependerá de efeitos aleatórios, ou ainda, no caso de conferirem uma vantagem seletiva ao novo hospedeiro, tendem não só a permanecer no organismo, mas também a disseminar-se rapidamente numa população, permitindo que esta rapidamente altere as suas características fenotípicas, através da aquisição de novos genes e funções ^{149,151}.

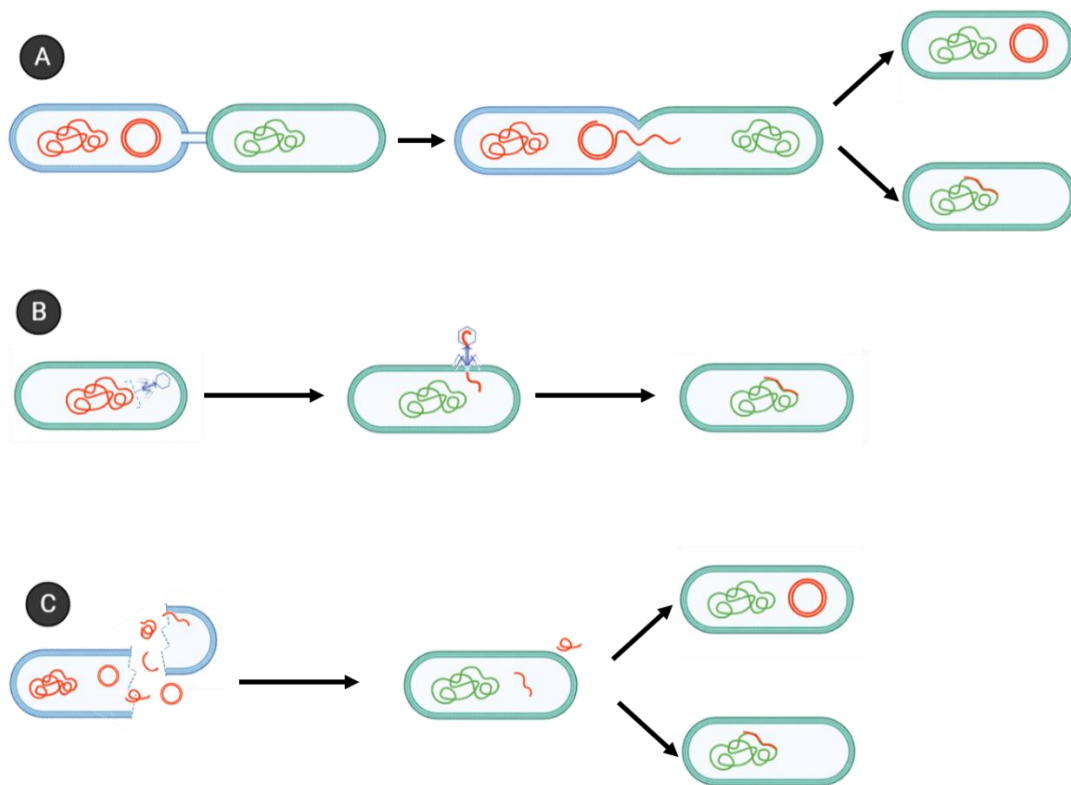


Figura 1.6. Representação esquemática dos três principais mecanismos de THG. (A) Conjugação; (B) Transdução; (C) Transformação natural. A vermelho está representado o fragmento de ADN transferido horizontalmente.

Em combinação com a seleção natural a troca genética através da THG, tem como resultado a evolução adaptativa de uma população bacteriana, no entanto, vários fatores podem limitar a ocorrência de THG entre bactérias¹⁵¹. Fatores como a disponibilidade de ADN no ambiente, a proximidade física entre células dadoras e células recetoras, que envolve reconhecimento específico, as características do próprio microambiente, o estado de competência bacteriana, a especificidade na captação de ADN, a incompatibilidade da sequência de ADN para integrar o genoma do hospedeiro, a atividade dos sistemas de restrição-modificação do hospedeiro, a incompatibilidade de plasmídeos e existência de enzimas de restrição, que podem degradar a cadeia de ADN por não a reconhecerem como fazendo parte do genoma podem limitar a THG^{149,152}. Na THG por transformação natural o recetor desempenha um papel preponderante no sucesso do processo, ao passo que no caso da conjugação, esse papel parece pertencer ao dador, uma vez que no caso da transformação natural o recetor é, muitas vezes, responsável por limitar a entrada e incorporação do novo ADN. A THG pode ocorrer sem necessidade de contato físico entre as duas células envolvidas, obtendo-se a chamada célula transformada. Posto isto, no caso

da transformação natural e da transdução se o fragmento de ADN a transferir for cromossómico, este tem de ser capaz de recombinar com o genoma do hospedeiro. Tal facto pode, também, ser uma limitação à THG de fragmentos de ADN cromossómico entre membros da mesma espécie ou de espécies relacionadas ¹⁵³.

A THG pode, por isso, promover mudanças em grande escala no genoma bacteriano, permitindo a evolução de genes e bactérias, o que em última instância pode resultar no surgimento de bactérias resistentes ¹⁵⁴.

1.8.1. Conjugação

A conjugação é caracterizada pela transferência de material genético entre duas bactérias mediada por junções célula a célula e um poro, através do qual o fragmento de ADN a transferir pode passar (Figura 1.6A) ^{149,155}. Este mecanismo de THG está associado à transferência de plasmídeos e a elementos integrativos e conjugativos.

Os plasmídeos são fragmentos de ADN circular extra-cromossómicos com capacidade de se replicarem autonomamente, estão presentes em quase todas as espécies bacterianas e o seu tamanho pode variar de alguns a centenas de pares de base. Estes elementos genéticos são, tal como referido, responsáveis pelo aumento da diversidade genética e podem ser transferidos entre populações bacterianas de estirpes diferentes, e até de espécies diferentes, por conjugação ou mobilização ¹⁵⁶. Os plasmídeos podem ser classificados em duas categorias de acordo com a sua mobilidade, ou seja por um lado temos os plasmídeos conjugativos (auto-transferíveis) que transportam toda a maquinaria necessária para a sua auto-transferência, e por outro lado os plasmídeos mobilizáveis (transferíveis apenas na presença de funções conjugativas adicionais) que apenas transportam um gene *relaxase* (enzima iniciadora da replicação), uma ou mais proteínas acessórias auxiliares e ainda um componente *oriT* (origem de transferência), não sendo, portanto, capazes de se mobilizar de forma autónoma. Os plasmídeos mobilizáveis, assim como, alguns fragmentos de ADN cromossómico podem ser transferidos por conjugação aquando a transferência dos plasmídeos conjugativos presentes numa mesma célula ^{149,155}. Existem ainda os plasmídeos não conjugativos nem mobilizáveis, sendo que a sua disseminação ocorre através de transformação natural ou transdução ¹⁵⁷.

O contacto célula a célula é o requisito fundamental para o sucesso da conjugação, logo, o ambiente bacteriano e a densidade celular influenciam a frequência com que ocorre a

conjugação¹⁵⁸. Embora o citoplasma da célula recetora possa limitar a entrada e a instalação do novo ADN, o sucesso da THG por conjugação depende, também, da compatibilidade entre a célula dadora e a célula recetora, no entanto, os plasmídeos conjugativos possuem uma região específica capaz de codificar genes responsáveis pelo controlo de replicação, isto é, responsáveis por garantir a distribuição das réplicas de um determinado plasmídeo durante a divisão celular^{149,159}. Deste modo, plasmídeos que contenham o mesmo sistema de controlo de replicação não podem coexistir numa mesma célula, designam-se, portanto por plasmídeos incompatíveis. Portanto, com base neste princípio, os plasmídeos foram classificados em diferentes grupos de incompatibilidade (Inc), sendo que dois plasmídeos pertencentes ao mesmo grupo de incompatibilidade não podem proliferar na mesma linha celular^{156,160}.

Os plasmídeos apresentam uma grande diversidade de funções, dependendo dos genes que transportam. Numa mesma célula podem, por isso, coexistir múltiplos plasmídeos, cada um com funções diferentes. Os plasmídeos podem, portanto, conter genes que contribuem para funções essenciais como a sua replicação, transferência e manutenção, assim como genes acessórios que contribuem para a sobrevivência do hospedeiro em ambientes inóspitos. Estes genes podem codificar resistência a antibióticos, resistência a iões metálicos, determinantes de virulência e patogenicidade que permitem que a bactéria colonize o hospedeiro e se defenda do seu sistema imunitário, funções metabólicas que permitem a utilização de diferentes nutrientes e produção de bacteriocinas responsáveis pela inibição do crescimento de outras estirpes bacterianas¹⁶¹.

Os genes *mcr* estão associados a EGMs, maioritariamente localizados em plasmídeos conjugativos do tipo IncI2, IncHI2, IncX4, IncF, e IncP, com elevado potencial de disseminação entre outras bactérias de Gram-negativo. Neste contexto, o papel da conjugação bacteriana na disseminação de genes *mcr* tem sido largamente investigado, havendo, por isso, vários estudos *in vitro* que mostram o seu envolvimento²⁷.

A capacidade de mobilização *in vitro* do plasmídeo IncI2 contendo o gene *mcr-I* foi demonstrada logo no primeiro estudo onde se descreveu pela primeira vez a sua ocorrência. Liu *et al.* provaram através de ensaios de conjugação a transferibilidade destes plasmídeos provenientes de isolados de *E. coli* de origem animal para uma estirpe de *E. coli* C600 resistente à estreptomicina, com uma frequência de conjugação de 10^{-1} a 10^{-3} células por célula recetora. No entanto, quando a célula recetora foi *K. pneumoniae* ou *P. aeruginosa*

não se verificou a ocorrência de conjugação²². Noutro estudo, os plasmídeos IncI2 e IncX4 provenientes de isolados de *E. coli*, obtidos de galinhas e portadores do gene *mcr-1* foram transferidos por conjugação para *E. coli* K-12 resistente à estreptomicina¹⁶². Similarmente, o gene *mcr-2*, identificado num plasmídeo IncX4 num isolado de *E. coli*, foi transferido por conjugação para uma estirpe de *E. coli* A15 resistente à rifampicina com uma frequência de cerca de 10^{-3} células por célula recetora¹²⁸.

No que respeita aos genes *mcr-3* e *mcr-4*, são, também, vários os estudos em que ambos os genes foram transferidos por conjugação. No primeiro caso, o plasmídeo IncHI2 foi transferido com sucesso para uma estirpe de *E. coli* EC600 resistente à rifampicina¹²⁹. No segundo caso, o gene *mcr-4* foi primeiramente identificado em plasmídeos ColE, um grupo de plasmídeos mobilizáveis. Assim, a transferência por conjugação para *E. coli* CSH26 apenas se verificou quando na bactéria dadora, para além do plasmídeo ColE, coexistia um plasmídeo conjugativo do tipo IncI2¹³⁰. No entanto, noutro estudo os genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-7* foram transferidos com sucesso de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *A. hydrophila* para *E. coli* J53 resistente à azida de sódio com frequência de conjugação compreendidas entre 10^{-6} e 10^{-3} células por célula recetora¹⁶³. À semelhança do gene *mcr-4* o gene *mcr-5* foi, também, primeiramente identificado num plasmídeo não conjugativo ColE num isolado de *Salmonella* spp.¹³¹, contudo a transferibilidade por conjugação do gene *mcr-5* foi confirmada, com uma frequência de conjugação de 10^{-6} , quando este foi identificado num plasmídeo IncXI em *E. coli*¹⁶⁴.

Os genes *mcr-7* e *mcr-8* inicialmente identificados em isolados de *K. pneumoniae* em plasmídeos IncI2 e IncFII, respetivamente, foram transferidos por conjugação para *E. coli* J53 resistente à azida de sódio, com uma frequência de conjugação de 10^{-4} células por célula recetora, no caso do gene *mcr-7*^{25,106}.

Finalmente, os genes *mcr-9* e *mcr-10* (inicialmente identificado num plasmídeo não conjugativo) foram, após a sua primeira identificação, também, transferidos por conjugação a partir de isolados de *Enterobacter cloacae* para *E. coli* EC600¹⁶⁵ e a partir de isolados de *Enterobacter roggenkampii* para *E. coli* J53¹⁶⁶, respectivamente. A frequência de conjugação foi de 10^{-6} células por célula recetora, no caso dos plasmídeos IncFII que transportavam o gene *mcr-10*¹⁶⁶.

1.8.2. Transdução

A transdução é o processo de transferência de material genético entre bactérias através da ação de um vírus, denominado bacteriófago ou simplesmente fago, tal como representado na Figura 1.6B. Quando o genoma de um fago é inserido e integrado no cromossoma da célula hospedeira, este é chamado de profago ¹⁶⁷. Os fagos são conhecidos como as entidades biológicas mais abundantes na Terra, são considerados uma força motriz na evolução e diversidade bacteriana ¹⁶⁸, uma vez que são capazes de regular a dinâmica da população bacteriana, bem como facilitar os eventos de THG. Durante a sua propagação, os fagos podem acidentalmente incorporar na sua cápside ADN bacteriano e, posteriormente, ejetar este ADN bacteriano quando infetam outras bactérias, este ADN pode então, recombinar-se no cromossoma ou replicar como um plasmídeo na célula hospedeira ¹⁶⁹. No processo de transdução generalizada, qualquer fragmento de ADN pode ser transferido, ao passo que na transdução especializada, somente o ADN adjacente ao local de ligação do fago é transferido ^{155,167,169}. A quantidade de ADN transferida durante a transdução é limitada pelo tamanho da cápside do fago, no entanto esta pode variar entre 10 a 100 quilo pares de bases. Nem todos os fagos são capazes de se transduzir, nem todas as bactérias são transduzíveis, tal depende dos recetores reconhecidos pelo bacteriófago, porém, na transdução tanto o ADN cromossómico como o plasmídico pode ser transferido. Por fim, as proteínas codificadas pelos fagos, não só medeiam a entrega do ADN no citoplasma do recetor, mas também promovem a sua integração no cromossoma e protegem-no da degradação pelas endonucleases de restrição presentes no hospedeiro ¹⁵⁵.

Estima-se que elementos semelhantes a fagos estejam envolvidos na aquisição de 20% do genoma bacteriano ¹⁷⁰. Ao contrário da transformação em que o ADN livre é mais suscetível à alteração e degradação, as partículas de fago são mais resistentes no ambiente ¹⁷¹. A título de exemplo, os solos agrícolas são ricos em bactérias e fagos, numa proporção de 1:10 a 1:100 ¹⁷², e o estrume animal, uma fonte de genes *mcr*, demonstrou ter uma maior prevalência de fagos quando comparado com outras fontes ambientais ¹⁷³. Alguns fagos ambientais abrigam genes de resistência a antibióticos (GRAs) e genes que conferem resistência a aminoglicosídeos, β -lactâmicos e sulfonamidas foram detetados em solos fertilizados ¹⁷⁴. Existem estudos que demonstram a transmissão de genes de virulência por transdução no solo ¹⁷⁵ ou de genes de resistência através de fagos isolados de efluentes de esgoto ¹⁷⁶.

No que respeita à transferência de genes de resistência à colistina, nomeadamente genes *mcr*, alguns estudos apontam a transdução mediada por fagos como outra força motriz para a THG no ambiente. O gene *mcr-1* foi, pela primeira vez detetado em fagos na China, com elevada frequência, em amostras provenientes de fezes de frango. Neste estudo, os fagos são apontados como potenciais e importantes reservatórios do gene *mcr-1* em ambientes de produção animal ¹⁷⁷. Ainda que numa abundância relativamente baixa, o gene *mcr-1* foi, também, detetado associado a fagos, em águas residuais sem tratamento, provenientes de suiniculturas na China ¹⁷⁸. Este gene tem sido identificado em plasmídeos semelhantes a fagos, isto é, fagos funcionais temperados que são encontrados no genoma do hospedeiro como plasmídeos ¹⁷⁹. Primeiramente em isolados de *E. coli* provenientes de suiniculturas ^{180,181}, e depois num isolado clínico de *K. pneumoniae* ¹⁸², os plasmídeos semelhantes a fagos representam novos veículos mediadores da disseminação dos genes *mcr-1* entre diferentes espécies. Foi, também, demonstrado o envolvimento dos bacteriófagos na incorporação do gene *mcr-1* em plasmídeos e no cromossoma de estirpes de *E. coli* em aquacultura ¹⁸³.

O gene *mcr-3.1* foi, também, identificado num plasmídeo IncA/C2 proveniente de um isolado clínico de *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis associado a outros genes de resistência antibióticos, nomeadamente, β -lactâmicos (*bla*_{CTX-M-55}), aminoglicosídeos [*aph(6)-Id*, *aac(3)-IIId*], anfenicóis (*floR*), sulfonamidas-trimetoprim (*sul2*) e tetraciclinas (*tetA*). Análises subsequentes a este plasmídeo revelaram que o gene *mcr-3.1* estava localizado num profago associado a sequências codificadoras de transposase, recombinase e proteínas da cápside ¹⁸⁴.

1.8.3. Transformação Natural

A transformação natural é caracterizada pela aquisição de ADN livre, a partir do ambiente ou secretado ativamente por células vivas por células recetoras competentes (Figura 1.6C), o que inclui a captação, incorporação e expressão funcional de ADN extracelular, podendo ocorrer em condições normais de crescimento bacteriano, sem que haja intervenção de fatores externos, como a permeabilização artificial das células como acontece na eletroporação ¹⁴⁹. O ADN livre é abundante no ambiente, uma vez que é libertado pelas células mortas ¹⁸⁵. Este ADN extracelular, por sua vez, demonstrou manter a sua transformabilidade por longos períodos de tempo ^{149,186}. A transformação natural pode

ocorrer em diversas espécies bacterianas e em diversos ambientes, como solo, água ^{187,188}, e alimentos ¹⁸⁹, existindo, por isso, várias espécies bacterianas naturalmente competentes no solo, como *Acinetobacter baylyi*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas stutzeri*, ou que fazem parte do trato digestivo animal, como *Campylobacter* spp. ¹⁸⁶. No caso do solo, o ADN adsorvido a diferentes partículas do solo é protegido contra a atividade de nucleases, o que permite que este persista inalterado e disponível para captura por células competentes ^{158,186}. A transformação natural é, dos três mecanismos de THG aqui descritos, o único que é iniciado pela célula recetora. Posto isto, para que a transformação natural ocorra é necessário que se atinja o chamado estado de competência, que se julga ser temporário na maioria das espécies e geralmente dependente da fase de crescimento em que a célula recetora se encontra, onde são ativadas um conjunto de 20 a 30 proteínas responsáveis por ligar, fragmentar, degradar e transportar o ADN e facilitar a sua chegada ao citosol ^{149,185}.

Após a passagem do ADN para o citoplasma, para que este persista, ele deve integrar o genoma bacteriano através de recombinação homóloga, recombinação não homóloga (responsável pela recombinação de sequências com pouca ou nenhuma homologia) ou transposição, embora estes dois tipos de eventos sejam mais raros. Deste modo, a transferência natural é responsável pela troca de ADN entre bactérias taxonomicamente distintas, e o sucesso da integração do ADN no genoma bacteriano é facilitado pela similaridade com o genoma da célula recetora, logo quanto maior for a divergência entre as sequências de ADN, mais baixa será a frequência de transformação ^{186,190}. No caso da aquisição de plasmídeos, nem sempre se verifica a sua incorporação no genoma do recetor, uma vez que basta ocorrer a sua reconstrução no citoplasma do novo hospedeiro ¹⁹¹.

Além da similaridade entre as sequências de ADN, o sucesso da transformação natural está dependente de diversos fatores, onde se podem incluir a quantidade de ADN disponível no ambiente, bem como a sua integridade (após a sua libertação este fica sujeito à ação de DNases), o nível de desenvolvimento de competência bacteriana para a transformação, e a atividade dos sistemas de restrição e modificação do ADN ^{152,190}. Para que a transformação ocorra, a célula recetora deverá estar no seu estado de competência e simultaneamente exposta ao ADN transformante ¹⁴⁹. A captação de ADN pode ser inibida por agentes quelantes, como o EDTA, uma vez que algumas espécies, como *A. baylyi* necessitam de catiões divalentes para que a transformação ocorra ¹⁸⁷. Por exemplo, o cálcio é essencial para a transformação natural de algumas espécies, e sua presença em alguns

ambientes naturais tem demonstrado induzir a competência natural, tal como demonstrado em isolados de *E. coli* que em diferentes ambientes de água doce (água de rio, água de nascente e água mineral engarrafada) e na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+} é capaz de desenvolver competência natural ^{158,188}. Não obstante, o esterco de suíno, além de possuir elevado teor de cálcio, possui também genes de resistência a antibióticos, como o gene *mcr-1*, sugerindo a potencial ocorrência deste fenômeno. Contudo, faltam ainda estudos que demonstrem o envolvimento da transformação natural na disseminação de genes *mcr* neste ambiente ^{158,192,193}.

Finalmente, a aquisição de genes que impliquem efeitos desvantajosos ou custo biológico para a célula tendem a competir contra a sua aquisição e herança estável, contudo, o custo biológico imposto a um determinado hospedeiro pode ser atenuado através de mutações compensatórias e assim a informação adquirida pode permanecer na população bacteriana ¹⁹⁴.

Embora reconhecido como um dos principais mecanismos de THG, não há, praticamente, estudos que explorem o envolvimento da transformação natural na disseminação de genes *mcr*. Contudo, o gene *mcr-5* detetado num isolado de *Aeromonas hydrophila* proveniente de suínos foi transferido por transformação natural para uma estirpe de *Aeromonas hydrophila* susceptível à colistina. A transformação natural é uma propriedade geral dos isolados ambientais de *Aeromonas* spp. e portanto, neste caso, o gene *mcr-5* revelou potencial para ser transferido entre espécies aquáticas de *Aeromonas* ¹⁹⁵.

1.9. Plataformas de disseminação de genes *mcr*

1.9.1. Animais produtores de alimento

A administração de antibióticos como a colistina em animais precipitou e favoreceu o crescimento da produção moderna e intensiva de animais produtores de alimento, permitindo o aumento da densidade animal, o seu desmame bem-sucedido, o seu crescimento mais rápido e um maior controlo económico de infeções causadas por enterobactérias, nomeadamente *E. coli* enterotoxigénica, com o objetivo de acompanhar o crescimento demográfico, e as mudanças nas tendências de consumo, que parecem evoluir no sentido da introdução de mais proteína na dieta, com o consequente aumento do consumo de produtos de origem animal ^{20,53,196}. Os animais produtores de alimento

constituem, assim, uma importante fonte patógenos de origem alimentar, os quais apresentam elevados níveis de resistência aos antibióticos, especialmente espécies da família *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, *Salmonella spp.* não tifoide, e do género *Campylobacter spp.*¹⁹⁶.

A disseminação de bactérias resistentes a antibióticos (BRAs) e a sua transmissão de animais para humanos através do consumo de alimentos de origem animal pode colocar em risco a saúde humana e levar à ineficácia da antibioterapia no tratamento das infeções por eles causadas¹⁹⁷.

Tal como abordado anteriormente, a resistência à colistina mediada por plasmídeos emergiu, provavelmente, nos animais de produção, uma vez que a colistina devido à sua nefrotoxicidade e neurotoxicidade foi pouco usada em medicina humana e porque a grande maioria das bactérias portadoras do gene *mcr* tem sido isolada a partir de amostras provenientes de animais de produção²¹. São vários os estudos epidemiológicos onde se demonstra que os animais produtores de alimento, como suínos, bovinos e aves de capoeira, constituem uma séria ameaça à saúde pública, pelo seu grau de exposição à colistina e pela sua propensão para disseminar os genes *mcr*, entre outros²⁶. De facto, a colistina foi usada em quantidades massivas na produção de suínos em larga escala um pouco por todo o mundo, em diversas fases do seu ciclo produtivo, de tal modo que foi demonstrada a existência de uma relação positiva entre a extensão da resistência à colistina entre *Enterobacteriaceae* provenientes de suínos e a quantidade de colistina usada durante o seu ciclo produtivo^{53,198,199}. Situação semelhante ocorreu na produção aviária, onde a colistina foi usada para tratamento da colibacilose leve e, também aqui, foi encontrada uma relação positiva entre o consumo de polimixinas e a emergência de resistência em *E. coli*^{198,199}. Ademais, foi, também, estabelecida uma correlação entre o consumo de animais expostos à colistina e a presença de *E. coli* na normal microbiota intestinal do Homem, evidenciando a presença de bactérias resistentes à colistina em animais produtores de alimento e a sua transmissão para humanos²⁰⁰.

Após a descoberta do gene *mcr-I* em isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* de origem animal, vários autores reportaram a presença deste gene em isolados essencialmente de isolados de *E. coli* obtidos a partir de animais produtores de alimento, distribuídos por todo o mundo^{22,26}. Não obstante, os genes *mcr*, também têm sido encontrados em isolados de *S. enterica*, embora com menos frequência do que em *E. coli*, inclusive em *S. enterica* serovar

Paratyphi, um serótipo associado ao desenvolvimento de febre entérica (febre paratifoide)¹³¹. Deste modo, *S. enterica* é um importante patógeno zoonótico, tanto em países em desenvolvimento quanto em países industrializados, podendo colonizar o intestino de animais adultos, especialmente o de aves e suínos¹⁷.

Atualmente, a colistina não é utilizada para tratar infecções em humanos causadas por *Salmonella spp.*, portanto o desenvolvimento de resistência à colistina não é clinicamente relevante. No entanto, a presença de genes *mcr* não deve ser de todo negligenciada neste patógeno zoonótico, uma vez que a resistência à colistina *in vivo* foi observada em isolados de *S. enterica* obtidos a partir de animais produtores de alimento^{90,201-203}, e pelo facto de estes genes estarem inseridos em elementos genéticos móveis com elevada capacidade para se transferir lateralmente para outras espécies, comensais ou patogénicas quer de origem animal, quer de origem humana. Além disso, as plataformas genéticas que carregam genes *mcr* transportam frequentemente outros genes de resistência dificultando a eficácia de outras classes de antibióticos¹⁴⁵.

Deste modo, a transmissão da resistência à colistina mediada por genes *mcr* de animais para humanos através da cadeia alimentar, gerou uma onda de preocupação na comunidade científica sobre as consequências do uso de colistina quer em medicina veterinária, quer na produção de animais produtores de alimento.

1.9.2. Estrume animal e efluentes agrícolas

A colistina, tal como referido anteriormente, foi amplamente utilizada em medicina veterinária para a prevenção e tratamento de infeções gastrointestinais, nomeadamente a diarreia pós-desmame em suínos, causada por *E. coli* enterohemorrágica^{20,204}. Após a administração, a colistina é fracamente absorvida no trato gastrointestinal do porco, sendo por isso, excretada diretamente nas fezes, acabando, subsequentemente por contaminar o solo. Além disso, o uso de colistina em suínos exerce pressão sobre a microbiota intestinal dos animais, o que tal como referido anteriormente, contribui para o desenvolvimento e disseminação da resistência através da seleção de estirpes resistentes, que em última instância acabam por atingir o solo, uma vez que são, também, excretadas nas fezes²⁰. Deste modo, a presença de resíduos de antibióticos, GRAs e BRAs faz do estrume animal, dos efluentes agrícolas e dos solos com eles fertilizados e irrigados, excelentes plataformas

de disseminação de resistência a antibióticos por mecanismos de THG, tal como referido anteriormente, e representado na Figura 1.7 ^{205,206}.

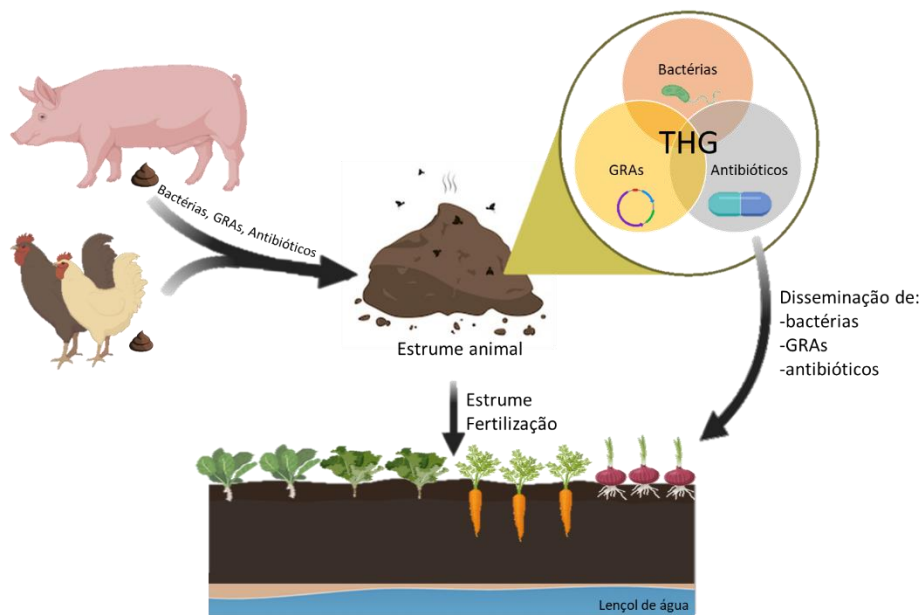


Figura 1.7. Disseminação da resistência antimicrobiana associada à aplicação de estrume animal em solos agrícolas.

O gene *mcr-1* é frequentemente detetado, especialmente em amostras provenientes de animais, sendo o mais prevalente quando comparado com os restantes nove genes homólogos ²⁶. Tal facto sugere que a emergência de resistência à colistina em humanos foi devida à mobilização de genes *mcr* provenientes de bactérias de origem animal que fluíram através da cadeia alimentar ²⁰⁷. Por conseguinte, a presença de colistina no estrume correlaciona-se com a deteção do gene *mcr-1* tanto em amostras de estrume de porco como de aves ^{192,207}. Similarmente, este gene foi, também, identificado em estrume de bovino e de cavalo ²⁰⁸. Portanto, o estrume animal e os efluentes agrícolas parecem ser importantes reservatórios de estirpes de *E. coli* resistentes à colistina, uma vez que estas carregam plasmídeos do tipo IncX4, IncI1, IncFII, IncFIB, IncXI e IncQ1 contendo o gene *mcr* ^{192,193,209}.

De forma a minimizar a emergência e disseminação da resistência aos antibióticos no ambiente torna-se, não só crucial a redução do seu uso na produção animal, mas também a adoção de estratégias de gestão que permitam a eliminação dos GRAs nos efluentes agrícolas e no estrume antes da irrigação dos solos e da sua aplicação como fertilizante. Neste sentido, a compostagem termofílica mostrou ser um método eficaz para a eliminação

do gene *mcr-1* no estrume animal, uma vez que após 22 dias de compostagem a alta temperatura (44-65 °C) a sua presença tornou-se completamente indetetável ²⁰⁸. No que respeita aos efluentes agrícolas, a combinação de tecnologias oxidativas baseadas na utilização de ozono, adsortivas baseadas no uso de carvão e areia filtrante e baseadas em membranas deverá ser considerada ²¹⁰.

1.9.3. Efluentes hospitalares

Os hospitais são importantes nichos ecológicos para BRAs e desempenham, portanto, um papel de extrema importância quer no surgimento quer na disseminação dessas bactérias e GRAs devido ao seu uso intensivo. Elevados níveis de BRAs e GRAs têm sido detetados em efluentes hospitalares, mesmo após o processo de tratamento de águas residuais ^{211,212}. Assim, as BRAs saem dos hospitais não só através da colonização dos doentes e profissionais de saúde, mas também através dos sistemas de águas residuais juntamente com resíduos de antibióticos que acabam por exercer pressão seletiva contínua sobre as BRAs ²¹². Exemplo disso são os vários estudos onde foram detetadas enterobactérias produtoras de beta-lactamases de espectro alargado (ESLBs) e/ou carbapenemases em efluentes hospitalares ^{211,213}.

Em contexto de medicina humana, a colistina é usada exclusivamente em ambiente hospitalar no tratamento de infeções por bactérias de Gram-negativo multirresistentes. À semelhança de outros genes, os genes *mcr* tem vindo a ser detetados em efluentes hospitalares, em diversos países e em diversas espécies bacterianas. O gene *mcr-1* foi detetado em efluentes hospitalares na China em *K. pneumoniae* e *Kluyvera ascorbata*, em plasmídeos conjugativos do tipo IncP e IncI2, respetivamente ^{214,215}. Os genes *mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* foram, igualmente, detetados em águas residuais hospitalares na Suécia, principalmente em isolados de *E. coli*, *S. enterica*, *Aeromonas* spp. e *K. pneumoniae* ²¹⁶.

O pré-tratamento destes resíduos hospitalares antes da sua descarga em estações de tratamento é de suma importância. Contudo, esta prática apenas é recomendada em alguns países, uma vez que estes efluentes são classificados como domésticos ^{212,217}. Portanto, os efluentes hospitalares apesar de não constituírem a principal fonte de bactérias em efluentes municipais, podem representar um importante e não negligenciável reservatório de BRAs e ARGs com relevância clínica ²¹⁷.

I.9.4. Frutas e vegetais frescos

Os produtos frescos, como as frutas e vegetais, têm sido cada vez mais implicados em surtos bacterianos²¹⁸. A transferência de bactérias de Gram-negativo multirresistentes para frutas e vegetais frescos pode ocorrer durante a sua produção, através do uso de águas residuais contaminadas para irrigação, através do uso de estrume animal como fertilizante dos solos, ou ainda durante a fase pós-colheita, nomeadamente no transporte, conservação e processamento pelos manipuladores²¹⁹. A ingestão de BRAs constitui um potencial problema de saúde pública, uma vez que estas bactérias não só podem colonizar o intestino do hospedeiro, mas também são capazes de trocar genes de resistência com bactérias intestinais durante a sua passagem e permanência no intestino, facilitando a sua disseminação em diversos ambientes. Posto isto, bactérias produtoras de ESBLs, cefalosporinases, carbapenemases e genes *mcr* têm sido isoladas em frutas e vegetais frescos em vários países do mundo²¹⁹⁻²²². Sobretudo na China e especialmente em espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, principalmente *E. coli* o gene *mcr-I* foi detetado em frutas e legumes frescos em 9 estudos, até à data, muitas vezes associado à deteção de ESBLs^{223,224}.

Apenas o gene *mcr-I* foi detetado neste tipo de matriz²²³. O gene *mcr-I* foi, pela primeira vez, detetado em isolados de *E. coli* produtores de ESBLs na Suíça, em vegetais importados da Tailândia e do Vietnã²²⁵. Em Portugal o gene *mcr-I* foi, também, detetado em dois isolados de *E. coli* provenientes de alfaces^{144,226}. No maior estudo efetuado até à data, vinte e três isolados de *E. coli* e um isolado de *E. cloacae* produtores de MCR-I foram isolados a partir de amostras de vegetais frescos obtidas entre maio de 2017 e abril de 2018, em nove províncias da China²²⁰. A ocorrência deste gene em vegetais é mais comum que em frutas, uma vez que foi maioritariamente isolado a partir de amostras de alface, seguido de amostras de tomate. No entanto, também se verificou a presença do gene *mcr-I* em folhas de couve-nabiça, pimento verde, folhas de espinafre, folhas de acácia, folhas de manjeriço, pepino, cenoura, folhas de chicória, *pak choi* e folhas de coentro^{223,224}. No que respeita às frutas, apenas em foi detetada a presença do gene *mcr-I* em maçã e laranja em dois isolados de *K. pneumoniae*²²⁷.

O consumo de vegetais e fruta crua pode, deste modo, constituir um importante veículo de disseminação de genes de resistência à colistina. O facto dos plasmídeos detetados em fruta e vegetais frescos serem idênticos ou com elevado grau de semelhança aos plasmídeos

encontrados em animais e humanos corrobora com a hipótese de estes genes de resistência emergirem através da cadeia alimentar, uma vez que as frutas e os vegetais estão muitas vezes na interface animal-ambiente-homem ²²⁴.

Em suma, a presença de BRAs e GRAs em frutas e vegetais frescos torna evidente a necessidade de dedicar maior atenção a este tipo de produtos, pois estes constituem possíveis reservatórios de bactérias de Gram-negativo produtoras de *mcr-1*, ESBLs e outros genes clinicamente relevantes. Medidas adequadas, que poderão passar pela melhoria da qualidade da água e das práticas agrícolas, deverão ser consideradas para garantir a segurança alimentar e saúde dos consumidores, evitando que estes produtos se tornem um futuro problema de saúde pública ^{223,224}.

I.10. Custo biológico da aquisição de genes de resistência à colistina

A aquisição de genes resistência é, geralmente, acompanhada de custo biológico para o hospedeiro. Este custo biológico é considerado um parâmetro chave na propagação e estabilidade de bactérias resistentes e traduz-se, então, numa redução do *fitness* do hospedeiro, isto é, a diminuição da sua capacidade de sobrevivência, expressa na redução da sua taxa de crescimento, virulência ou transmissão ²²⁸⁻²³⁰.

A resistência mediada por plasmídeos está, geralmente, associada a um menor custo biológico quando comparada à resistência mediada por mutações cromossómicas ²³⁰. Além disso, os plasmídeos podem ainda conter vários genes de resistência, permitindo, sob condições de pressão seletiva com diferentes antibióticos, a co-seleção de estirpes contendo estes plasmídeos com múltiplos genes de resistência ²³¹. Assim, na presença de um antibiótico, a pressão seletiva leva à prevalência de populações bacterianas com vantagem adaptativa que, ao tornarem-se dominantes, podem propagar-se e, posteriormente, ser transmitidas a um novo hospedeiro ²³². Deste modo, o custo biológico e a redução do *fitness* imposto pela aquisição de um determinante de resistência sugere a perda da resistência na ausência de pressão seletiva por um antibiótico, levando a uma redução na frequência de bactérias resistentes através da seleção natural, ou seja, bactérias resistentes vão sendo substituídas por bactérias suscetíveis ao longo do tempo ^{231,233}. No entanto, na ausência de pressão seletiva, o gene pode permanecer na bactéria, uma vez que

o custo biológico inerente à sua aquisição pode ser atenuado por mutações compensatórias tanto no plasmídeo, quanto no ADN cromossômico ^{228,231}. De facto, nem todos os genes de resistência a antibióticos implicam custo biológico para os seus hospedeiros, alguns genes apresentam carácter neutro, já outros acabam, mesmo, por melhorar o seu *fitness* ^{234,235}.

A resistência à colistina devido a mutações cromossômicas tem sido associada à redução de *fitness*, principalmente em *A. baumannii* ⁹³. Em contrapartida, em *K. pneumoniae*, algumas mutações cromossômicas em genes como *mgrB* não acarretam custo biológico significativo ⁸⁴, ao passo que mutações nos genes *pmrB* implicam redução de *fitness* em *K. pneumoniae* ²²⁸. Em *E. coli*, a ocorrência mutações ao nível do gene *pmrB*, responsável pela resistência à colistina através da fosforilação do lípido A, parece, também, influenciar negativamente o *fitness da célula* ²³⁶. Baseado em ensaios de competição *in vitro* e, embora sem se verificar redução na taxa de crescimento, mutações nos genes *phoPQ*, *pmrAB* e *eptA* que em última instância catalisam a adição de PEtN ao lípido A do LPS, também representam custo biológico em estirpes de *E. coli*, tal facto, explica a razão pela qual a resistência à colistina devido a mutações cromossômicas tenha aumentado lentamente entre bactérias de Gram-negativo ⁹³.

No que respeita aos genes *mcr* verificou-se que apesar da aquisição de plasmídeos contendo o gene *mcr-1* exercer um efeito benéfico no hospedeiro uma vez que melhora a sua sobrevivência na presença de colistina, esta está associada a um custo biológico significativo em isolados de *K. pneumoniae* ²³⁷. Similarmente, outros estudos mostraram que a expressão do gene *mcr-1* implica custo biológico para o hospedeiro, traduzindo-se numa diminuição da taxa de crescimento, degradação significativa da membrana celular e perda de *fitness* em isolados de *E. coli* ^{238,239}. Em sentido oposto, está descrito em alguns estudos que a aquisição de plasmídeos, contendo o gene *mcr-1*, não tem impacto significativo em termos de custo biológico para o hospedeiro ^{93,240}. Além disso, verificou-se que em isolados isogénicos de *K. pneumoniae*, a resistência à colistina mediada pela aquisição do gene *mcr-1.2*, está associada a menores custos biológicos, quando comparada com uma mutação no gene *pmrB* localizado no cromossoma ²²⁸.

Para além do gene *mcr-1*, os genes *mcr-3* e *mcr-4* parecem também implicar custo biológico para os seus hospedeiros, afetando o crescimento bacteriano, e no caso do gene *mcr-3* a integridade da parede celular. No entanto, verificou-se que apesar dos três genes

implicarem a redução do *fitness* do hospedeiro, o gene *mcr-4* está associado a menores reduções, seguido do gene *mcr-3*, estando o gene *mcr-1* associado a maiores reduções de *fitness* ^{241,242}.

Tal como referido anteriormente o custo biológico da aquisição de novos genes ou mutações, está, muitas vezes, associado a mutações compensatórias. Neste contexto, foram identificados vários polimorfismos de um único nucleótido, contudo o seu papel na redução do custo biológico associado aos plasmídeos que transportam os genes *mcr* ainda não é conhecido, podendo por isso representar novos mecanismos de compensação ²⁴³.

Com vista à redução da resistência aos antibióticos, a restrição e proibição do seu uso é, muitas vezes, uma das estratégias adotadas, uma vez que se assume que a expressão de genes de resistência implica custo biológico para o hospedeiro, o que por sua vez, significaria a sua perda na ausência de pressão seletiva ²⁴⁴. Contudo, face ao exposto, a reversibilidade da resistência não é linear, pois outros fatores além da pressão seletiva podem ditar a estabilidade e manutenção dos determinantes de resistência numa população.

1.1.1. Objetivos da tese

A dificuldade crescente no tratamento de infeções bacterianas constitui, atualmente, um grave problema de saúde pública mundial devido ao surgimento e evolução da resistência aos antibióticos, traduzindo-se em graves consequências clínicas e económicas. Os antibióticos, como a colistina, um antibiótico de importância crítica em medicina humana devido à crescente resistência bacteriana, têm sido usados rotineiramente na produção intensiva de animais produtores de alimentos quer no tratamento, quer na prevenção de infeções bacterianas, especialmente em animais jovens. Tal prática pode levar à seleção de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos no trato intestinal destes animais.

Neste contexto, a identificação da resistência à colistina mediada por plasmídeo assume particular importância e é motivo de grande preocupação por parte da comunidade científica mundial, devido à sua disseminação entre a microbiota intestinal e potenciais e agentes patogénicos, concomitantemente com outros genes de resistência localizados no mesmo plasmídeo, e devido à sua potencial disseminação através da cadeia alimentar por manipulação e/ou consumo de produtos alimentares contaminados.

Os resultados deste estudo poderão fornecer alguma evidência para suportar a tomada de decisão sobre a descontinuação do uso de colistina em animais, uma vez que esta é, ainda, uma questão em debate.

Posto isto, os principais objetivos deste trabalho de investigação são:

- Determinar a prevalência dos genes de resistência à colistina mediada por plasmídeo em *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* provenientes de animais produtores de alimento;
- Entender como a administração de antibióticos em animais produtores de alimentos afeta o surgimento de resistência a antibióticos em *Escherichia coli* e sua manutenção no intestino, numa cadeia de produção, isto é, desde o nascimento até o peso de abate ser atingido;
- Avaliar o custo biológico *in vitro* conferido pela aquisição de plasmídeos contendo o gene *mcr-1*;
- Avaliar a capacidade de disseminação da resistência à colistina por mecanismos de transferência horizontal de genes (conjugação e transformação natural);
- Avaliar a virulência dos isolados resistentes à colistina, através da capacidade de formação de biofilme.

I.12. Referências Bibliográficas

1. Ellis S, Ong E. *Disseminated Infections: A Clinical Overview*. Molecular Medical Microbiology. 2015;637-53. doi: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00036-6. Epub 2014 Sep 29.
2. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*. 2007;449(7164):811-8. doi:10.1038/nature06245
3. van der Meer JW. The infectious disease challenges of our time. *Frontiers in Public Health*. 2013;1:7. doi:10.3389/fpubh.2013.00007
4. Fauci AS, Morens DM. The perpetual challenge of infectious diseases. *The New England Journal of Medicine*. 2012;366(5):454-61. doi:10.1056/NEJMra1108296
5. Cloeckaert A, Kuchler K. Grand Challenges in Infectious Diseases: Are We Prepared for Worst-Case Scenarios? *Front Microbiol*. 2020;11:613383. doi:10.3389/fmicb.2020.613383
6. Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 1929 Jun;10(3):226-36.
7. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol*. 2010;1:134. doi:10.3389/fmicb.2010.00134
8. Laxminarayan R, Matsoso P, Pant S, et al. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet*. 2016;387(10014):168-75. doi:10.1016/S0140-6736(15)00474-2
9. Medina E, Pieper DH. Tackling Threats and Future Problems of Multidrug-Resistant Bacteria. *Current topics in microbiology and immunology*. 2016;398:3-33. doi:10.1007/82_2016_492
10. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2010;74(3):417-33. doi:10.1128/MMBR.00016-10
11. Carlet J, Collignon P, Goldmann D, et al. Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. *Lancet*. 2011;378(9788):369-71. doi:10.1016/S0140-6736(11)60401-7
12. Morehead MS, Scarbrough C. Emergence of global antibiotic resistance. *Primary care*. Sep 2018;45(3):467-484. doi:10.1016/j.pop.2018.05.006
13. Bello A, Dingle TC. What's That Resistance Mechanism? Understanding Genetic Determinants of Gram-Negative Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2018;40:165-174. doi:10.1016/j.clinmicnews.2018.10.001
14. Lima T, Domingues S, Da Silva GJ. Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. *Microorganisms*. 2019;7(2). doi:10.3390/microorganisms7020055
15. Murray; CJL, Ikuta; KS, Sharara; F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629-655. doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0

16. Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical microbiology reviews*. 2011;24(4):718-33. doi:10.1128/CMR.00002-11
17. Antunes P, Mourão J, Campos J, Peixe L. Salmonellosis: The role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*. 2016;22:110-121. doi:10.1016/j.cmi.2015.12.004
18. Summers AO. Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem. *Animal Biotechnology*. 2006;17(2):125-135. doi:10.1080/10495390600957217
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. CLSI document M31-A3*. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
20. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. Review. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7(1789). doi:10.3389/fmicb.2016.01789
21. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*. 2017;30:557-596. doi:10.1128/CMR.00064-16
22. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(2):161-8. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7
23. Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y. Towards understanding *mcr*-like colistin resistance. *Trends in Microbiology*. 2018;26:794-808. doi:10.1016/j.tim.2018.02.006
24. Cao L, Li X, Xu Y, Shen J. Prevalence and molecular characteristics of *mcr-1* colistin resistance in *Escherichia coli* : isolates of clinical infection from a Chinese University Hospital. *Infection and Drug Resistance*. 2018;11:1597-1603. doi: 10.2147/IDR.S166726
25. Wang X, Wang Y, Zhou Y, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging Microbes & Infections*. 2018;7:122. doi:10.1038/s41426-018-0124-z
26. Valiakos G, Kapna I. Colistin Resistant *mcr* Genes Prevalence in Livestock Animals (Swine, Bovine, Poultry) from a Multinational Perspective. A Systematic Review. *Veterinary sciences*. 2021;8(11). doi:10.3390/vetsci8110265
27. Mmatli M, Mbelle NM, Osei Sekyere J. Global epidemiology, genetic environment, risk factors and therapeutic prospects of *mcr* genes: A current and emerging update. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2022;12:941358. doi:10.3389/fcimb.2022.941358
28. Aslam B, Khurshid M, Arshad MI, et al. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2021;11:771510. doi:10.3389/fcimb.2021.771510
29. Binsker U, Kasbohrer A, Hammerl JA. Global colistin use: a review of the emergence of resistant *Enterobacterales* and the impact on their genetic basis. *FEMS microbiology reviews*. 2022;46(1). doi:10.1093/femsre/fuab049

30. Padda KP, Puri A, Chanway CP. *Paenibacillus polymyxa*: A prominent biofertilizer and biocontrol agent for sustainable agriculture. In: Meena VS, Mishra PK, Bisht JK, Pattanayak A, eds. *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture: Volume 2: Applications in Crop Production and Protection*. Springer Singapore; 2017:165-191.
31. Gallardo-Godoy A, Muldoon C, Becker B, et al. Activity and predicted nephrotoxicity of synthetic antibiotics based on Polymyxin B. *Journal of medicinal chemistry*. 2016;59(3):1068-1077. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01593
32. Nation RL, Velkov T, Li J. Colistin and Polymyxin B: Peas in a pod, or chalk and cheese? *Clinical Infectious Diseases*. 2014;59(1):88-94. doi:10.1093/cid/ciu213
33. Velkov T, Thompson PE, Nation RL, Li J. Structure–activity relationships of polymyxin antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010;53(5):1898-1916. doi:10.1021/jm900999h
34. Bertani B, Ruiz N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*. Aug 2018;8(1). doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018
35. Hancock REW, Scott MG. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(16):8856-8861. doi:10.1073/pnas.97.16.8856
36. Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(1):18-29. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03734.x
37. Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *The Journal of antibiotics*. 2014;67(2):147-51. doi:10.1038/ja.2013.111
38. Sampson TR, Liu X, Schroeder MR, Kraft CS, Burd EM, Weiss DS. Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(11):5642-9. doi:10.1128/AAC.00756-12
39. Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;40(9):1333-1341. doi:10.1086/429323
40. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Current Medical Research and Opinion*. 2015;31(4):707-721. doi:10.1185/03007995.2015.1018989
41. Gurjar M. Colistin for lung infection: an update. *Journal of intensive care*. 2015;3(1):3-3. doi:10.1186/s40560-015-0072-9
42. Nation RL, Li J. Colistin in the 21st century. *Current opinion in infectious diseases*. 2009;22(6):535-43. doi:10.1097/QCO.0b013e328332e672
43. Loho T, Dharmayanti A. Colistin: an antibiotic and its role in multiresistant Gram-negative infections. *Acta medica Indonesiana*. 2015;47(2):157-68.
44. Catry B, Cavalieri M, Baptiste K, et al. 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. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015;46(3):297-306. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005>

45. Romandini A, Pani A, Schenardi PA, Pattarino GAC, De Giacomo C, Scaglione F. Antibiotic Resistance in Pediatric Infections: Global Emerging Threats, Predicting the Near Future. *Antibiotics*. 2021;10(4). doi:10.3390/antibiotics10040393

46. Nang SC, Azad MAK, Velkov T, Zhou QT, Li J. Rescuing the Last-Line Polymyxins: Achievements and Challenges. *Pharmacological reviews*. 2021;73(2):679-728. doi:10.1124/pharmrev.120.000020

47. Pogue JM, Tam VH. Toxicity in Patients. *Advances in experimental medicine and biology*. 2019;1145:289-304. doi:10.1007/978-3-030-16373-0_17

48. Baker SJ, Payne DJ, Rappuoli R, De Gregorio E. Technologies to address antimicrobial resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115(51):12887-12895. doi:10.1073/pnas.1717160115

49. Nabarro D, Wannous C. The potential contribution of livestock to food and nutrition security: the application of the One Health approach in livestock policy and practice. *Revue scientifique et technique*. 2014;33(2):475-85. doi:10.20506/rst.33.2.2292

50. Thornton PK. Livestock production: recent trends, future prospects. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2010;365(1554):2853-67. doi:10.1098/rstb.2010.0134

51. Lekagul A, Tangcharoensathien V, Yeung S. Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. *Veterinary and animal science*. 2019;7:100058. doi:10.1016/j.vas.2019.100058

52. Kempf I, Jouy E, Chauvin C. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(6):598-606. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016

53. Rhouma M, Beaudry F, Letellier A. Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2016;48(2):119-126. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.008>

54. Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms*. 2020;8(11). doi:10.3390/microorganisms8111716

55. European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2021. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020'. Eleventh ESVAC report (EMA/58183/2021).

56. Walsh TR, Wu Y. China bans colistin as a feed additive for animals. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(10):1102-1103. doi:10.1016/S1473-3099(16)30329-2

57. European Medicines Agency, 2019. Categorisation of antibiotics in the European Union. EMA/CVMP/CHMP/682198/2017.

58. Matuschek E, Ahman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European*

Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2018;24(8):865-870. doi:10.1016/j.cmi.2017.11.020

59. World Health Organization (2020). GLASS Whole-Genome Sequencing for Surveillance of Antimicrobial Resistance. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011007> [Consultado em 15 agosto, 2022].

60. World Health Organization (2021). GLASS: The Detection and Reporting of Colistin Resistance. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/glass-the-detection-and-reporting-of-colistin-resistance-2nd-ed> [Consultado a 15 agosto, 2022].

61. Satlin MJ, Lewis JS, Weinstein MP, et al. Clinical and Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Position Statements on Polymyxin B and Colistin Clinical Breakpoints. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2020;71(9):e523-e529. doi:10.1093/cid/cia121

62. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022.

63. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 32nd ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2022.

64. Leshaba TMS, Mbelle NM, Osei Sekyere J. Current and emerging polymyxin resistance diagnostics: A systematic review of established and novel detection methods. *Journal of applied microbiology*. 2022;132(1):8-30. doi:10.1111/jam.15184

65. Boyen F, Vangroenweghe F, Butaye P, et al. Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. *Veterinary microbiology*. 2010;144(3-4):359-62. doi:10.1016/j.vetmic.2010.01.010

66. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:643-643. doi:10.3389/fmicb.2014.00643

67. Khuntayaporn P, Thirapanmethee K, Chomnawang MT. An Update of Mobile Colistin Resistance in Non-Fermentative Gram-Negative Bacilli. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:882236. doi:10.3389/fcimb.2022.882236

68. Zhu Y, Lu J, Han ML, et al. Polymyxins Bind to the Cell Surface of Unculturable *Acinetobacter baumannii* and Cause Unique Dependent Resistance. *Advanced science*. 2020;7(15):2000704. doi:10.1002/advs.202000704

69. Ito-Kagawa M, Koyama Y. Selective cleavage of a peptide antibiotic, colistin by colistinase. *The Journal of antibiotics*. 1980;33(12):1551-5. doi:10.7164/antibiotics.33.1551

70. Li J, Nation RL, Turnidge JD, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases*. 2006;6(9):589-601. doi:10.1016/S1473-3099(06)70580-1

71. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(3):449-65. doi:10.1128/CMR.00006-08

72. Gunn JS. The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol*. 2008;16(6):284-90. doi:10.1016/j.tim.2008.03.007

73. Hua J, Jia X, Zhang L, Li Y. The Characterization of Two-Component System PmrA/PmrB in *Cronobacter sakazakii*. *Front Microbiol.* 2020;11:903. doi:10.3389/fmicb.2020.00903
74. Jeannot K, Bolard A, Plesiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents.* May 2017;49(5):526-535. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.11.029
75. Chin CY, Gregg KA, Napier BA, Ernst RK, Weiss DS. A PmrB-Regulated Deacetylase Required for Lipid A Modification and Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2015;59(12):7911-4. doi:10.1128/AAC.00515-15
76. Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas MV, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2014;58(8):4762-6. doi:10.1128/AAC.00084-14
77. Olaitan AO, Dia NM, Gautret P, et al. Acquisition of extended-spectrum cephalosporin- and colistin-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Newport by pilgrims during Hajj. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45(6):600-4. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.01.010
78. Diene SM, Merhej V, Henry M, et al. The rhizome of the multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new "killer bugs" are created because of a sympatric lifestyle. *Molecular biology and evolution.* 2013;30(2):369-83. doi:10.1093/molbev/mss236
79. Groisman EA. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *Journal of bacteriology.* 2001;183(6):1835-42. doi:10.1128/JB.183.6.1835-1842.2001
80. Park SY, Groisman EA. Signal-specific temporal response by the *Salmonella* PhoP/PhoQ regulatory system. *Molecular microbiology.* 2014;91(1):135-44. doi:10.1111/mmi.12449
81. Choi MJ, Ko KS. Mutant prevention concentrations of colistin for *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2014;69(1):275-7. doi:10.1093/jac/dkt315
82. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Enterobacteriaceae*. *Emerging infectious diseases.* 2016;22(6):1038-43. doi:10.3201/eid2206.151840
83. Lippa AM, Goulian M. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS genetics.* 2009;5(12):e1000788. doi:10.1371/journal.pgen.1000788
84. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2014;58(10):5696-703. doi:10.1128/AAC.03110-14
85. Poirel L, Jayol A, Bontron S, et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2015;70(1):75-80. doi:10.1093/jac/dku323

86. Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator *mgrB*: an epidemiological and molecular study. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44(6):500-7. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.07.020
87. Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(1):536-43. doi:10.1128/AAC.04037-14
88. Cheng YH, Lin TL, Lin YT, Wang JT. Amino Acid Substitutions of CrrB Responsible for Resistance to Colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(6):3709-16. doi:10.1128/AAC.00009-16
89. Sato T, Shiraishi T, Hiyama Y, et al. Contribution of Novel Amino Acid Alterations in PmrA or PmrB to Colistin Resistance in *mcr*-Negative *Escherichia coli* Clinical Isolates, Including Major Multidrug-Resistant Lineages O25b:H4-ST131-H30Rx and Non-x. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018;62(9)doi:10.1128/AAC.00864-18
90. Quesada A, Porrero MC, Tellez S, Palomo G, Garcia M, Dominguez L. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(1):71-4. doi:10.1093/jac/dku320
91. Olaitan AO, Thongmalayvong B, Akkhavong K, et al. Clonal transmission of a colistin-resistant *Escherichia coli* from a domesticated pig to a human in Laos. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015;70(12):3402-4. doi:10.1093/jac/dkv252
92. Sundaramoorthy NS, Suresh P, Selva Ganesan S, GaneshPrasad A, Nagarajan S. Restoring colistin sensitivity in colistin-resistant *E. coli*: Combinatorial use of MarR inhibitor with efflux pump inhibitor. *Sci Rep*. 25 2019;9(1):19845. doi:10.1038/s41598-019-56325-x
93. Choi Y, Lee JY, Lee H, et al. Comparison of Fitness Cost and Virulence in Chromosome- and Plasmid-Mediated Colistin-Resistant *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*. 2020;11:798. doi:10.3389/fmicb.2020.00798
94. Bastidas-Caldes C, de Waard JH, Salgado MS, et al. Worldwide Prevalence of *mcr*-mediated Colistin-Resistance *Escherichia coli* in Isolates of Clinical Samples, Healthy Humans, and Livestock-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens*. 2022;11(6). doi:10.3390/pathogens11060659
95. Khanawapee A, Kerdsin A, Chopjitt P, et al. Distribution and Molecular Characterization of *Escherichia coli* Harboring *mcr* Genes Isolated from Slaughtered Pigs in Thailand. *Microb Drug Resist*. 2021;27(7):971-979. doi:10.1089/mdr.2020.0242
96. Perez JC, Groisman EA. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Molecular microbiology*. 2007;63(1):283-93. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05512.x
97. Nishino K, Hsu FF, Turk J, Cromie MJ, Wosten MM, Groisman EA. Identification of the lipopolysaccharide modifications controlled by the *Salmonella* PmrA/PmrB system mediating resistance to Fe(III) and Al(III). *Molecular microbiology*. 2006;61(3):645-54. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05273.x

98. Trent MS, Pabich W, Raetz CR, Miller SI. A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*. 2001;276(12):9083-92. doi:10.1074/jbc.M010730200
99. Lee H, Hsu FF, Turk J, Groisman EA. The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *Journal of bacteriology*. 2004;186(13):4124-33. doi:10.1128/JB.186.13.4124-133.2004
100. Zhang Z, Tian X, Shi C. Global Spread of MCR-Producing *Salmonella enterica* Isolates. *Antibiotics*. 2022;11(8)doi:10.3390/antibiotics11080998
101. Cheng YH, Lin TL, Pan YJ, Wang YP, Lin YT, Wang JT. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(5):2909-13. doi:10.1128/AAC.04763-14
102. De Majumdar S, Yu J, Fookes M, et al. Correction: Elucidation of the RamA Regulon in *Klebsiella pneumoniae* Reveals a Role in LPS Regulation. *PLoS pathogens*. 2016;12(5):e1005649. doi:10.1371/journal.ppat.1005649
103. Srinivasan VB, Rajamohan G. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(9):4449-62. doi:10.1128/AAC.02284-12
104. Padilla E, Llobet E, Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Bengoechea JA, Alberti S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(1):177-83. doi:10.1128/AAC.00715-09
105. Azam M, Gaiind R, Yadav G, et al. Colistin Resistance Among Multiple Sequence Types of *Klebsiella pneumoniae* Is Associated With Diverse Resistance Mechanisms: A Report From India. *Front Microbiol*. 2021;12:609840. doi:10.3389/fmicb.2021.609840
106. Yang YQ, Li YX, Lei CW, Zhang AY, Wang HN. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018;73(7):1791-1795. doi:10.1093/jac/dky111
107. Kang KN, Klein DR, Kazi MI, et al. Colistin heteroresistance in *Enterobacter cloacae* is regulated by PhoPQ-dependent 4-amino-4-deoxy-l-arabinose addition to lipid A. *Molecular microbiology*. 2019;111(6):1604-1616. doi:10.1111/mmi.14240
108. Huang L, Feng Y, Zong Z. Heterogeneous resistance to colistin in *Enterobacter cloacae* complex due to a new small transmembrane protein. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2019;74(9):2551-2558. doi:10.1093/jac/dkz236
109. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):508-516. doi:10.1080/22221751.2020.1732231
110. Kim JS, Yu JK, Jeon SJ, et al. Distribution of *mcr* genes among carbapenem-resistant *Enterobacteriales* clinical isolates: high prevalence of *mcr*-positive *Enterobacter cloacae* complex in Seoul, Republic of Korea. *Int J Antimicrob Agents*. 2021;58(5):106418. doi:10.1016/j.ijantimicag.2021.106418

111. Wang S, Ju X, Dong N, et al. Emergence of Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-8.2* in Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* Isolated from a Patient in China. *Microbiol Spectr.* 2022;10(4):e0121722. doi:10.1128/spectrum.01217-22
112. Xu T, Ji Y, Song J, et al. A novel host of MCR-5 belonging to *Enterobacter* spp. isolated from hospital sewage water. *Environ Microbiol Rep.* 2021;13(2):234-237. doi:10.1111/1758-2229.12937
113. Li XP, Fang LX, Jiang P, et al. Emergence of the colistin resistance gene *mcr-1* in *Citrobacter freundii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49(6):786-787. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.04.004
114. Ma M, Zhang X, Cheng Y, et al. Genomic characterisation of an ST401 *Citrobacter freundii* isolate harbouring *mcr-9*, isolated from bullfrog, China. *J Glob Antimicrob Resist.* 2022;29:390-392. doi:10.1016/j.jgar.2022.05.008
115. Raetz CR, Guan Z, Ingram BO, et al. Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *Journal of lipid research.* 2009;50 Suppl:S103-8. doi:10.1194/jlr.R800060-JLR200
116. Saleh NM, Hesham MS, Amin MA, Samir Mohamed R. Acquisition of Colistin Resistance Links Cell Membrane Thickness Alteration with a Point Mutation in the *lpxD* Gene in *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics.* 2020;9(4)doi:10.3390/antibiotics9040164
117. Formosa C, Herold M, Vidailac C, Duval RE, Dague E. Unravelling of a mechanism of resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* using atomic force microscopy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2015;70(8):2261-70. doi:10.1093/jac/dkv118
118. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompарт CM, Alberti S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infection and immunity.* 2004;72(12):7107-14. doi:10.1128/IAI.72.12.7107-7114.2004
119. Hirakawa H, Nishino K, Hirata T, Yamaguchi A. Comprehensive studies of drug resistance mediated by overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology.* 2003;185(6):1851-6. doi:10.1128/JB.185.6.1851-1856.2003
120. Zhai YJ, Huang H, Liu J, et al. CpxR overexpression increases the susceptibility of *acrB* and *cpxR* double-deleted *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to colistin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2018;73(11):3016-3024. doi:10.1093/jac/dky320
121. Lacour S, Bechet E, Cozzone AJ, Mijakovic I, Grangeasse C. Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance. *PloS one.* 2008;3(8):e3053. doi:10.1371/journal.pone.0003053
122. Lacour S, Doublet P, Obadia B, Cozzone AJ, Grangeasse C. A novel role for protein-tyrosine kinase Etk from *Escherichia coli* K-12 related to polymyxin resistance. *Research in microbiology.* 2006;157(7):637-41. doi:10.1016/j.resmic.2006.01.003
123. Ni W, Li Y, Guan J, et al. Effects of Efflux Pump Inhibitors on Colistin Resistance in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2016;60(5):3215-8. doi:10.1128/AAC.00248-16

124. Parra-Lopez C, Baer MT, Groisman EA. Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*. *The EMBO journal*. 1993;12(11):4053-62. doi:10.1002/j.1460-2075.1993.tb06089.x
125. Son SJ, Huang R, Squire CJ, Leung IKH. MCR-1: a promising target for structure-based design of inhibitors to tackle polymyxin resistance. *Drug Discov Today*. 2019;24(1):206-216. doi:10.1016/j.drudis.2018.07.004
126. Partridge SR, Di Pilato V, Doi Y, et al. Proposal for assignment of allele numbers for mobile colistin resistance (*mcr*) genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018;73(10):2625-2630. doi:10.1093/jac/dky262
127. Poirel L, Nordmann P. Emerging plasmid-encoded colistin resistance: the animal world as the culprit? *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016;71(8):2326-7. doi:10.1093/jac/dkw074
128. Xavier BB, Lammens C, Ruhul R, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2016;21(27). doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280
129. Yin W, Li H, Shen Y, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio*. 2017:e00543-17. doi:10.1128/mBio
130. Carattoli A, Villa L, Feudi C, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*. 2017;22(31). doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589
131. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72:3317-3324. doi:10.1093/jac/dkx327
132. AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, et al. *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018;73(10):2904. doi:10.1093/jac/dky272
133. Carroll LM, Gaballa A, Guldimann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *mBio*. 2019;10(3). doi:10.1128/mBio.00853-19
134. Kieffer N, Nordmann P, Poirel L. *Moraxella* Species as Potential Sources of MCR-Like Polymyxin Resistance Determinants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(6). doi:10.1128/AAC.00129-17
135. Sun J, Fang LX, Wu Z, et al. Genetic Analysis of the IncX4 Plasmids: Implications for a Unique Pattern in the *mcr-1* Acquisition. *Sci Rep*. 2017;7(1):424. doi:10.1038/s41598-017-00095-x
136. Snestrud E, McGann P, Chandler M. The Birth and Demise of the IS*ApII*-*mcr-1*-IS*ApII* Composite Transposon: the Vehicle for Transferable Colistin Resistance. *mBio*. 2018;9(1). doi:10.1128/mBio.02381-17

137. Snesrud E, He S, Chandler M, et al. A Model for Transposition of the Colistin Resistance Gene *mcr-1* by IS*Ap11*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(11):6973-6976. doi:10.1128/AAC.01457-16
138. Maciucă IE, Cummins ML, Cozma AP, et al. Genetic Features of *mcr-1* Mediated Colistin Resistance in CMY-2-Producing *Escherichia coli* From Romanian Poultry. *Front Microbiol*. 2019;10:2267. doi:10.3389/fmicb.2019.02267
139. Shafiq M, Huang J, Shah JM, Ali I, Rahman SU, Wang L. Characterization and resistant determinants linked to mobile elements of ESBL-producing and *mcr-1*-positive *Escherichia coli* recovered from the chicken origin. *Microb Pathog*. 2021;150:104722. doi:10.1016/j.micpath.2020.104722
140. Zhuge X, Jiang M, Tang F, et al. Avian-source *mcr-1*-positive *Escherichia coli* is phylogenetically diverse and shares virulence characteristics with *E. coli* causing human extra-intestinal infections. *Veterinary microbiology*. 2019;239:108483. doi:10.1016/j.vetmic.2019.108483
141. Zhao F, Feng Y, Lu X, McNally A, Zong Z. Remarkable Diversity of *Escherichia coli* Carrying *mcr-1* from Hospital Sewage with the Identification of Two New *mcr-1* Variants. *Front Microbiol*. 2017;8:2094. doi:10.3389/fmicb.2017.02094
142. Szabo M, Kiss J, Nagy Z, Chandler M, Olsz F. Sub-terminal sequences modulating IS30 transposition in vivo and in vitro. *J Mol Biol*. 2008;375(2):337-52. doi:10.1016/j.jmb.2007.10.043
143. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2020;75(11):3087-3095. doi:10.1093/jac/dkaa205
144. Manageiro V, Jones-Dias D, Ferreira E, Canica M. Plasmid-Mediated Colistin Resistance (*mcr-1*) in *Escherichia coli* from Non-Imported Fresh Vegetables for Human Consumption in Portugal. *Microorganisms*. 2020;8(3). doi:10.3390/microorganisms 8030429
145. Figueiredo R, Card RM, Nunez J, et al. Detection of an *mcr-1*-encoding plasmid mediating colistin resistance in *Salmonella enterica* from retail meat in Portugal. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016;71(8):2338-40. doi:10.1093/jac/dkw240
146. Lima T, Fernandes L, Matias M, et al. Longitudinal Study Detects the Co-Carriage of ESBL and *mcr-1* and *-4* Genes in *Escherichia coli* Strains in a Portuguese Farrow-to-Finish Swine Herd. *Animals (Basel)*. 2022;12(17). doi:10.3390/ani12172209
147. Villa T, Feijoo-Siota L, Sánchez-Pérez A, Rama JL, Sieiro C. Horizontal Gene Transfer in Bacteria, an Overview of the Mechanisms Involved. 2019:3-76.
148. Cheng JH, Tang XY, Cui JF. Effect of long-term manure slurry application on the occurrence of antibiotic resistance genes in arable purple soil (entisol). *Sci Total Environ*. 2019;647:853-861. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.028
149. Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(9):711-21. doi:10.1038/nrmicro1234
150. Nakamura Y, Itoh T, Matsuda H, Gojobori T. Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nat Genet*. 2004;36(7):760-6. doi:10.1038/ng1381

151. Baptiste E, Susko E, Leigh J, MacLeod D, Charlebois RL, Doolittle WF. Do orthologous gene phylogenies really support tree-thinking? *BMC Evol Biol.* 2005;5:33. doi:10.1186/1471-2148-5-33
152. Nielsen KM, Johnsen PJ, Bensasson D, Daffonchio D. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ Biosafety Res.* 2007;6(1-2):37-53. doi:10.1051/ebr:2007031
153. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(9):722-32. doi:10.1038/nrmicro1235
154. Ochman H, Lerat E, Daubin V. Examining bacterial species under the specter of gene transfer and exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102 Suppl 1:6595-9. doi:10.1073/pnas.0502035102
155. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature.* 2000;405(6784):299-304. doi:10.1038/35012500
156. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of microbiological methods.* 2005;63(3):219-28. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018
157. Smillie C, Garcillan-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz F. Mobility of plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR.* 2010;74(3):434-52. doi:10.1128/MMBR.00020-10
158. Chee-Sanford JC, Mackie RI, Koike S, et al. Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes following Land Application of Manure Waste. <https://doi.org/10.2134/jeq2008.0128>. *Journal of Environmental Quality.* 2009;38(3):1086-1108. doi:<https://doi.org/10.2134/jeq2008.0128>
159. Datta N, Hedges RW. Compatibility groups among fi - R factors. *Nature.* 1971;234(5326):222-3. doi:10.1038/234222a0
160. Datta N, Hughes VM. Plasmids of the same Inc groups in *Enterobacteria* before and after the medical use of antibiotics. *Nature.* 1983;306(5943):616-7. doi:10.1038/306616a0
161. Hayes F. The function and organization of plasmids. *Methods in molecular biology.* 2003;235:1-17. doi:10.1385/1-59259-409-3:1
162. Al Mana H, Johar AA, Kassem, II, Eltai NO. Transmissibility and Persistence of the Plasmid-Borne Mobile Colistin Resistance Gene, *mcr-I*, Harbored in Poultry-Associated *E. coli*. *Antibiotics.* 2022;11(6). doi:10.3390/antibiotics11060774
163. Tartor YH, Gharieb RMA, Abd El-Aziz NK, et al. Virulence Determinants and Plasmid-Mediated Colistin Resistance *mcr* Genes in Gram-Negative Bacteria Isolated From Bovine Milk. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2021;11:761417. doi:10.3389/fcimb.2021.761417
164. Guo S, Tay MYF, Thu AK, et al. Conjugative IncXI Plasmid Harboring Colistin Resistance Gene *mcr-5.1* in *Escherichia coli* Isolated from Chicken Rice Retailed in Singapore. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2019;63(11)doi:10.1128/AAC.01043-19
165. Zhou H, Wang S, Wu Y, et al. Carriage of the *mcr-9* and *mcr-10* genes in clinical strains of the *Enterobacter cloacae* complex in China: a prevalence and molecular

epidemiology study. *Int J Antimicrob Agents*. 2022;106645. doi:10.1016/j.ijantimicag.2022.106645

166. Lei CW, Zhang Y, Wang YT, Wang HN. Detection of Mobile Colistin Resistance Gene *mcr-10.1* in a Conjugative Plasmid from *Enterobacter roggenkampii* of Chicken Origin in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2020;64(10). doi:10.1128/AAC.01191-20

167. Fortier LC, Sekulovic O. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*. 2013;4(5):354-65. doi:10.4161/viru.24498

168. Mann NH. The third age of phage. *PLoS Biol*. 2005;3(5):e182. doi:10.1371/journal.pbio.0030182

169. Chiang YN, Penades JR, Chen J. Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS pathogens*. 2019;15(8):e1007878. doi:10.1371/journal.ppat.1007878

170. Calero-Caceres W, Ye M, Balcazar JL. Bacteriophages as Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance. *Trends Microbiol*. 2019;27(7):570-577. doi:10.1016/j.tim.2019.02.008

171. Berglund B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infect Ecol Epidemiol*. 2015;5:28564. doi:10.3402/iee.v5.28564

172. Batinovic S, Wassef F, Knowler SA, et al. Bacteriophages in Natural and Artificial Environments. *Pathogens*. 2019;8(3). doi:10.3390/pathogens8030100

173. Niu YD, McAllister TA, Xu Y, Johnson RP, Stephens TP, Stanford K. Prevalence and impact of bacteriophages on the presence of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle and their environment. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(5):1271-8. doi:10.1128/AEM.02100-08

174. Ross J, Topp E. Abundance of Antibiotic Resistance Genes in Bacteriophage following Soil Fertilization with Dairy Manure or Municipal Biosolids, and Evidence for Potential Transduction. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(22):7905-13. doi:10.1128/AEM.02363-15

175. van Overbeek LS, van Doorn J, Wichers JH, van Amerongen A, van Roermund HJ, Willemsen PT. The arable ecosystem as battleground for emergence of new human pathogens. *Front Microbiol*. 2014;5:104. doi:10.3389/fmicb.2014.00104

176. Evans TJ, Crow MA, Williamson NR, et al. Characterization of a broad-host-range flagellum-dependent phage that mediates high-efficiency generalized transduction in, and between, *Serratia* and *Pantoea*. *Microbiology (Reading)*. 2010;156(Pt1):240-247. doi:10.1099/mic.0.032797-0

177. Yang Y, Xie X, Tang M, et al. Exploring the profile of antimicrobial resistance genes harboring by bacteriophage in chicken feces. *Sci Total Environ*. 2020;700:134446. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134446

178. Wang M, Xiong W, Liu P, et al. Metagenomic Insights Into the Contribution of Phages to Antibiotic Resistance in Water Samples Related to Swine Feedlot Wastewater Treatment. *Front Microbiol*. 2018;9:2474. doi:10.3389/fmicb.2018.02474

179. Pfeifer E, Moura de Sousa JA, Touchon M, Rocha EPC. Bacteria have numerous distinctive groups of phage-plasmids with conserved phage and variable plasmid gene repertoires. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(5):2655-2673. doi:10.1093/nar/gkab064
180. Zhang C, Feng Y, Liu F, et al. A Phage-Like IncY Plasmid Carrying the *mcr-1* Gene in *Escherichia coli* from a Pig Farm in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2017;61(3). doi:10.1128/AAC.02035-16
181. Li R, Xie M, Lv J, Wai-Chi Chan E, Chen S. Complete genetic analysis of plasmids carrying *mcr-1* and other resistance genes in an *Escherichia coli* isolate of animal origin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2017;72(3):696-699. doi:10.1093/jac/dkw509
182. Zhou W, Liu L, Feng Y, Zong Z. A P7 Phage-Like Plasmid Carrying *mcr-1* in an ST15 *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate. *Front Microbiol.* 2018;9:11. doi:10.3389/fmicb.2018.00011
183. Kalova A, Gelbicova T, Overballe-Petersen S, Litrup E, Karpiskova R. Characterisation of Colistin -Resistant *Enterobacteriales* and *Acinetobacter* Strains Carrying *mcr* Genes from Asian Aquaculture Products. *Antibiotics.* 2021;10(7)doi:10.3390/antibiotics10070838
184. Pan Y, Fang Y, Feng Y, et al. Discovery of *mcr-3.1* gene carried by a prophage located in a conjugative IncA/C2 plasmid from a *Salmonella Choleraesuis* clinical isolate. *J Infect.* 2021;82(3):414-451. doi:10.1016/j.jinf.2020.09.036
185. Chen I, Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(3):241-9. doi:10.1038/nrmicro844
186. Domingues S, Nielsen KM. Horizontal Gene Transfer: Uptake of Extracellular DNA by Bacteria. In: Schmidt TM, ed. *Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition)*. Academic Press; 2019:629-644
187. Lorenz MG, Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev.* 1994;58(3):563-602. doi:10.1128/mr.58.3.563-602.1994
188. Baur B, Hanselmann K, Schlimme W, Jenni B. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(10):3673-8. doi:10.1128/aem.62.10.3673-3678.1996
189. Bauer F, Hertel C, Hammes WP. Transformation of *Escherichia coli* in foodstuffs. *Syst Appl Microbiol.* 1999;22(2):161-8. doi:10.1016/S0723-2020(99)80061-7
190. Majewski J. Sexual isolation in bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;199(2):161-9. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10668.x
191. Winter M, Buckling A, Harms K, Johnsen PJ, Vos M. Antimicrobial resistance acquisition via natural transformation: context is everything. *Curr Opin Microbiol.* 2021;64:133-138. doi:10.1016/j.mib.2021.09.009
192. Brauer A, Telling K, Laht M, et al. Plasmid with Colistin Resistance Gene *mcr-1* in Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Pig Slurry in Estonia. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2016;60(11):6933-6936. doi:10.1128/AAC.00443-16

193. Zheng B, Huang C, Xu H, et al. Occurrence and Genomic Characterization of ESBL-Producing, MCR-1-Harboring *Escherichia coli* in Farming Soil. *Front Microbiol.* 2017;8:2510. doi:10.3389/fmicb.2017.02510
194. Wiedenbeck J, Cohan FM. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS microbiology reviews.* 2011;35(5):957-76. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00292.x
195. Ma S, Sun C, Hulth A, et al. Mobile colistin resistance gene mcr-5 in porcine *Aeromonas hydrophila*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2018;73(7):1777-1780. doi:10.1093/jac/dky110
196. Heredia N, Garcia S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Anim Nutr.* 2018;4(3):250-255. doi:10.1016/j.aninu.2018.04.006
197. Vinayamohan PG, Pellissery AJ, Venkitanarayanan K. Role of horizontal gene transfer in the dissemination of antimicrobial resistance in food animal production. *Current Opinion in Food Science.* 2022;47:100882. doi:10.1016/j.cofs.2022.100882
198. European Centre for Disease P, Control, European Food Safety A, European Medicines A. ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals: Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. *EFSA J.* 2017;15(7):e04872. doi:10.2903/j.efsa.2017.4872
199. European Centre for Disease P, Control, European Food Safety A, European Medicines A. Third joint inter-agency report on integrated analysis of consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA: JIACRA III 2016-2018. *EFSA J.* 2021;19(6):e06712. doi:10.2903/j.efsa.2021.6712
200. Shen Y, Zhou H, Xu J, et al. Anthropogenic and environmental factors associated with high incidence of *mcr-1* carriage in humans across China. *Nat Microbiol.* 2018;3(9):1054-1062. doi:10.1038/s41564-018-0205-8
201. EMA. Colistin. Summary report (2). Accessed December 2018, https://www.ema.europa.eu/documents/mrl-report/colistin-summary-report-2-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf
202. Kempf I, Fleury MA, Drider D, et al. What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe? *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42(5):379-83. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.06.012
203. Morales AS, Fragoso de Araujo J, de Moura Gomes VT, et al. Colistin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains isolated from swine in Brazil. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:109795. doi:10.1100/2012/109795
204. Davis CA, Janssen EM. Environmental fate processes of antimicrobial peptides daptomycin, bacitracins, and polymyxins. *Environ Int.* 2020;134:105271. doi:10.1016/j.envint.2019.105271
205. Chen T, Zhang S, Zhu R, et al. Distribution and driving factors of antibiotic resistance genes in treated wastewater from different types of livestock farms. *Sci Total Environ.* 2022;849:157837. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.157837

206. Yang F, Gu Y, Zhou J, Zhang K. Swine waste: A reservoir of high-risk *bla*_{NDM} and *mcr-I*. *Sci Total Environ*. 2019;683:308-316. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.05.251
207. Xia X, Wang Z, Fu Y, et al. Association of colistin residues and manure treatment with the abundance of *mcr-I* gene in swine feedlots. *Environ Int*. 2019;127:361-370. doi:10.1016/j.envint.2019.03.061
208. Gao Y, Lu C, Shen D, et al. Elimination of the risks of colistin resistance gene (*mcr-I*) in livestock manure during composting. *Environ Int*. 2019;126:61-68. doi:10.1016/j.envint.2019.02.015
209. Guenther S, Falgenhauer L, Semmler T, et al. Environmental emission of multiresistant *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-I* from German swine farms. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(5):1289-1292. doi:10.1093/jac/dkw585
210. Savin M, Alexander J, Bierbaum G, et al. Antibiotic-resistant bacteria, antibiotic resistance genes, and antibiotic residues in wastewater from a poultry slaughterhouse after conventional and advanced treatments. *Sci Rep*. 2021;11(1):16622. doi:10.1038/s41598-021-96169-y
211. Hassoun-Kheir N, Stabholz Y, Kreft JU, et al. Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review. *Sci Total Environ*. 2020;743:140804. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140804
212. Hocquet D, Muller A, Bertrand X. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *J Hosp Infect*. 2016;93(4):395-402. doi:10.1016/j.jhin.2016.01.010
213. Ramalho R, Mezzomo LC, Machado W, et al. The occurrence of antimicrobial residues and antimicrobial resistance genes in urban drinking water and sewage in Southern Brazil. *Braz J Microbiol*. 2022;53(3):1483-1489. doi:10.1007/s42770-022-00786-2
214. Zhao F, Feng Y, Lu X, McNally A, Zong Z. IncP Plasmid Carrying Colistin Resistance Gene *mcr-I* in *Klebsiella pneumoniae* from Hospital Sewage. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(2). doi:10.1128/AAC.02229-16
215. Zhao F, Zong Z. *Kluyvera ascorbata* Strain from Hospital Sewage Carrying the *mcr-I* Colistin Resistance Gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(12):7498-7501. doi:10.1128/AAC.01165-16
216. Hutinel M, Larsson DGJ, Flach CF. Antibiotic resistance genes of emerging concern in municipal and hospital wastewater from a major Swedish city. *Sci Total Environ*. 2022;812:151433. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.151433
217. Manaia CM, Macedo G, Fatta-Kassinos D, Nunes OC. Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(4):1543-1557. doi:10.1007/s00253-015-7202-0
218. Holzel CS, Tetens JL, Schwaiger K. Unraveling the Role of Vegetables in Spreading Antimicrobial-Resistant Bacteria: A Need for Quantitative Risk Assessment. *Foodborne Pathog Dis*. 2018;15(11):671-688. doi:10.1089/fpd.2018.2501

219. Richter L, Du Plessis EM, Duvenage S, Korsten L. Occurrence, Identification, and Antimicrobial Resistance Profiles of Extended-Spectrum and *AmpC* beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* from Fresh Vegetables Retailed in Gauteng Province, South Africa. *Foodborne Pathog Dis.* 2019;16(6):421-427. doi:10.1089/fpd.2018.2558
220. Liu BT, Li X, Zhang Q, Shan H, Zou M, Song FJ. Colistin-Resistant *mcr*-Positive *Enterobacteriaceae* in Fresh Vegetables, an Increasing Infectious Threat in China. *Int J Antimicrob Agents.* 2019;54(1):89-94. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.04.013
221. Liu BT, Song FJ. Emergence of two *Escherichia coli* strains co-harboring *mcr-I* and *bla*_{NDM} in fresh vegetables from China. *Infect Drug Resist.* 2019;12:2627-2635. doi:10.2147/IDR.S211746
222. Touati A, Mairi A, Baloul Y, et al. First detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 in fresh vegetables from Bejaia city, Algeria. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017;9:17-18. doi:10.1016/j.jgar.2017.02.006
223. Chelaghma W, Loucif L, Bendahou M, Rolain JM. Vegetables and Fruit as a Reservoir of beta-Lactam and Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria: A Review. *Microorganisms.* 2021;9(12)doi:10.3390/microorganisms9122534
224. Chelaghma W, Loucif L, Bendjama E, Cherak Z, Bendahou M, Rolain JM. Occurrence of Extended Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria in Fresh Vegetables, an Increasing Human Health Concern in Algeria. *Antibiotics.* 2022;11(8). doi:10.3390/antibiotics11080988
225. Zurfuh K, Poirel L, Nordmann P, Nuesch-Inderbinen M, Hachler H, Stephan R. Occurrence of the Plasmid-Borne *mcr-I* Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2016;60(4):2594-5. doi:10.1128/AAC.00066-16
226. Jones-Dias D, Manageiro V, Ferreira E, et al. Architecture of Class 1, 2, and 3 Integrons from Gram Negative Bacteria Recovered among Fruits and Vegetables. *Front Microbiol.* 2016;7:1400. doi:10.3389/fmicb.2016.01400
227. Yang F, Shen C, Zheng X, et al. Plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-I* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from market retail fruits in Guangzhou, China. *Infect Drug Resist.* 2019;12:385-389. doi:10.2147/IDR.S194635
228. Giordano C, Klak A, Barnini S, et al. Reduced Fitness Costs of *mcr-I.2* Compared to Mutated *pmrB* in Isogenic Colistin-Resistant KPC-3-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere.* 2019;4(6)doi:10.1128/mSphere.00551-19
229. Andersson DI. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6(5):452-6. doi:10.1016/j.mib.2003.09.001
230. Andersson DI. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(5):461-5. doi:10.1016/j.mib.2006.07.002
231. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(4):260-71. doi:10.1038/nrmicro2319
232. Bjorkman J, Andersson DI. The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug Resist Updat.* 2000;3(4):237-245. doi:10.1054/drup.2000.0147

233. Tietgen M, Semmler T, Riedel-Christ S, et al. Impact of the colistin resistance gene *mcr-1* on bacterial fitness. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;51(4):554-561. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.11.011
234. Baker S, Duy PT, Nga TV, et al. Fitness benefits in fluoroquinolone-resistant *Salmonella Typhi* in the absence of antimicrobial pressure. *Elife*. 2013;2:e01229. doi:10.7554/eLife.01229
235. Maharjan R, Ferenci T. The fitness costs and benefits of antibiotic resistance in drug-free microenvironments encountered in the human body. *Environ Microbiol Rep*. 2017;9(5):635-641. doi:10.1111/1758-2229.12564
236. Phan MD, Nhu NTK, Achard MES, et al. Modifications in the *pmrB* gene are the primary mechanism for the development of chromosomally encoded resistance to polymyxins in uropathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(10):2729-2736. doi:10.1093/jac/dkx204
237. Nang SC, Morris FC, McDonald MJ, et al. Fitness cost of *mcr-1*-mediated polymyxin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018;73(6):1604-1610. doi:10.1093/jac/dky061
238. He T, Wei R, Zhang L, et al. Characterization of NDM-5-positive extensively resistant *Escherichia coli* isolates from dairy cows. *Vet Microbiol*. 2017;207:153-158. doi:10.1016/j.vetmic.2017.06.010
239. Yang Q, Li M, Spiller OB, et al. Balancing *mcr-1* expression and bacterial survival is a delicate equilibrium between essential cellular defence mechanisms. *Nat Commun*. 2017;8(1):2054. doi:10.1038/s41467-017-02149-0
240. Wang R, Liu Y, Zhang Q, et al. The prevalence of colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from food animals in China: coexistence of *mcr-1* and *bla_{NDM}* with low fitness cost. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;51(5):739-744. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.01.023
241. Yang QE, MacLean C, Papkou A, et al. Compensatory mutations modulate the competitiveness and dynamics of plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* clones. *ISME J*. 2020;14(3):861-865. doi:10.1038/s41396-019-0578-6
242. Zhang H, Hou M, Xu Y, et al. Action and mechanism of the colistin resistance enzyme MCR-4. *Commun Biol*. 2019;2:36. doi:10.1038/s42003-018-0278-1
243. Ma K, Feng Y, Zong Z. Fitness cost of a *mcr-1*-carrying IncHI2 plasmid. *PLoS One*. 2018;13(12):e0209706. doi:10.1371/journal.pone.0209706
244. Wu J, Dong X, Zhang L, Lin Y, Yang K. Reversing Antibiotic Resistance Caused by Mobile Resistance Genes of High Fitness Cost. *mSphere*. 2021;6(3):e0035621. doi:10.1128/mSphere.00356-21

CAPÍTULO II

Longitudinal Study Detects the Co-Carriage of ESBL and *mcr-1* and *-4* Genes in *Escherichia coli* Strains in a Portuguese Farrow-to-Finish Swine Herd

O conteúdo deste capítulo encontra-se publicado como:

Artigo científico

- Tiago Lima, Laura Fernandes, Marta Matias, Ana Mateus, Eduarda Silveira, Sara Domingues, Constança Pomba, Gabriela Jorge Da Silva. Longitudinal Study Detects the Co-Carriage of ESBL and *mcr-1* and *-4* Genes in *Escherichia coli* Strains in a Portuguese Farrow-to-Finish Swine Herd. **Animals** 2022; 12(17):2209. doi: 10.3390/ani12172209

Sequência depositada no GenBank

- Tiago Lima, Laura Fernandes, Marta Matias, Ana Mateus, Eduarda Silveira, Sara Domingues, Constança Pomba, Gabriela Jorge Da Silva. *Escherichia coli* strain IG5-3 phosphoethanolamine-lipid A transferase MCR-4.7 (*mcr-4*) gene, *mcr-4.7* allele, complete cds. GenBank accession number: ON586856

2.1. Abstract

Cephalosporins and polymyxins are employed in antimicrobial protocols to control and treat neonatal infections and post-weaning diarrhoea in swine operations. We conducted a longitudinal study to evaluate the colonization and transmission of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in sows and their piglets in a farrow-to-finish operation, focusing on characterization of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and *mcr* genes, virulence traits and genetic relatedness. A total of 293 *E. coli* isolates were obtained from faecal samples collected in five time points. At birth *bla*_{CTX-M-1group} cluster was detected in *E. coli* isolates from 9 sows and 49 piglets (73.41%), while in the following four' piglets sampling moments it was detected in 91.8%, 57.6%, 71.4% and 97.4%. The gene *mcr-1* was detected in *E. coli* from one sow and from three piglets from different litters at birth and increased in the first weeks of piglet life (68.85%, 100%, 90% and 8.1%). A new *mcr-4* allele, *mcr-4.7*, was identified in 3.28%, 28.57%, 7.5% of *E. coli* isolates. Most *mcr*-positive *E. coli* isolates (96.7%) carried *bla*_{CTX-M-1Group} genes and 93.33% carried both *mcr-4* and *mcr-1*. CTX-M-1 and CTX-M-32 were the most predominant ESBLs. Plasmids belonged to IncII, IncF and IncN groups. Most isolates belong to phylogenetic group BI; PAI IV₅₃₆ marker was detected in nine isolates. The strains were kept in the different stages of the piglets' life. The use of ceftiofur and colistin may explain the high prevalence and co-selection of *bla*_{CTX-M-1Group} and *mcr-1* and/or *-4* genes, contributing to the maintenance of resistant and virulent isolates throughout the pig life cycle that may reach the food chain.

Keywords: antimicrobial resistance; swine; colistin; public health; livestock.

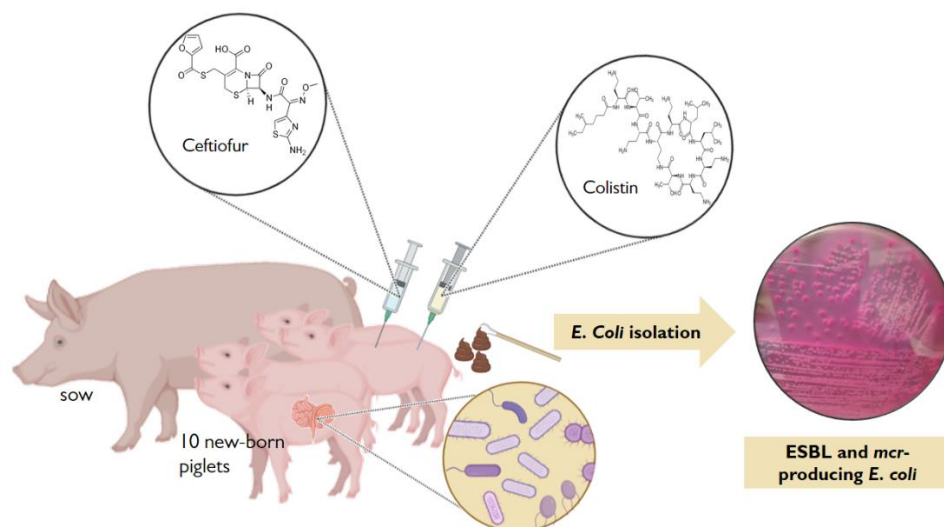


Figure 2.1. Chapter graphical abstract.

2.2. Introduction

The ever-increasing emergence and dissemination of antimicrobial resistance is a huge concern in clinical, veterinary and environmental settings worldwide. Due to global demographic growth and consequent increasing demand for livestock products, livestock production has become intensive, with significant improvements in breeding, nutrition and animal health ^{1,2}.

In veterinary medicine and intensive farming production, antibiotics are largely used not only with prophylactic, metaphylactic and therapeutic purposes but are also used in subtherapeutic doses as growth promotants, despite tight restrictions in some countries associated with this practice. In the particular case of intensive pig husbandry systems, for many years, antimicrobials, such as polymyxins, β -lactams and aminoglycosides, have been used prophylactically during the nursery period to control Gram-negative infections in piglets ³. Colistin and third-generation cephalosporins, which are classified by the World Health Organization as “Highest Priority Critically Important Antimicrobials” for human medicine ⁴ are now not allowed to be used as prophylactic agents in animals. Third-generation cephalosporins such as ceftiofur are a part of the beta-lactam antibiotic class and are some of the most widely used antibiotics approved for systemic treatment of bacterial infections in intensive animal production ⁵. The veterinary administration of extended-spectrum cephalosporins for extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacterales* in animals may increase zoonotic transmission of resistant bacteria carrying plasmid-mediated ESBL resistance genes ⁶, therefore acting as potential reservoirs of clinically important antibiotic-resistance genes through the food-producing animals’ gut microbiota ⁵.

Another antibiotic that has been widely used in animal husbandry due to its efficiency and low cost is colistin, administered mainly during the nursery period ^{3,7}. Colistin use in the human hospital setting has also become one of the last resorts in the treatment of bacterial infections caused by multidrug-resistant (MDR) bacteria, in particular of carbapenemase-producing *Enterobacterales* ⁸. Until 2015, prevalence of colistin resistance was considered low and all known resistance mechanisms were chromosomally encoded ⁷. However, a plasmid-mediated colistin resistance gene (*mcr-1* gene) was identified for the first time as part of a conjugative plasmid in *Escherichia coli* isolates of animal origin from

China ⁹. Since then, plasmid-borne *mcr* alleles have been reported in numerous studies, mostly detected in *E. coli* of animal origin ¹⁰.

Faecal carriage of ESBL and *mcr* genes has been widely identified in both the human clinical setting and animal reservoirs ^{10,11}, and while resistance levels to third generation cephalosporins and colistin remains generally low in pork meat produced in the European Union (EU) ¹², the food chain may significantly increase the dissemination and acquisition of third generation cephalosporin and colistin resistance worldwide ¹³. In 2020, the main meat produced in the EU was pork, with 23 million tonnes, nearly doubling the quantity of the second and third top meat protein sources produced (13.6 million tonnes of poultry and 6.8 million tonnes of beef, respectively) ¹⁴. These data highlight the need for food safety measures and surveillance in farrow-to-finish swine herds due to the major role of pork in human food and also the need to understand if antibiotic use in pigs allows the selection of resistant strains to be carried from birth through the production cycle until slaughter and ultimately enter the food chain. We performed a longitudinal study during 5 months to assess the prevalence and transmission of ESBL and *mcr*-producing *E. coli* in the sows and their piglets from farrow-to-finish in Portuguese intensive farm production, characterizing their antimicrobial resistance, virulence features and genetic relatedness.

2.3. Materials and Methods

2.3.1. Selection of Herds and Sampling Scheme

This study was conducted on an industrial swine farm located in Portugal in the Alentejo region, where ceftiofur was routinely used. A total of 10 sows with newly born litters were randomly selected, and 7 new-born healthy piglets from each corresponding litter were ear-tagged with a code for litter (letter A–J) and piglet (number 1–7) identification ($n=79$). One of these newborn piglets died after being tagged. A single dose of ceftiofur (Naxcel[®] 20 mg/piglet IM) was prophylactically administered to all new-borns to prevent neonatal infections, namely *Streptococcus suis* infections, navel infections, arthritis and colibacillosis diarrhoea. Colistin was also administered as part of the ongoing antimicrobial protocol for post-weaning diarrhoea due to *E. coli*.

Faecal samples were collected from each sow when giving birth. Piglet samples were collected with sterile swabs at 5 time points over 5 months between November 2011 and

April 2012: (i) at birth (before ceftiofur administration); (ii) after weaning; (iii) at the nursery unit; (iv) at the finishing unit; and (v) before leaving the finishing unit (one day before transportation to the abattoir).

2.3.2. Isolation and Identification of *Escherichia coli*

Each faecal sample was enriched for 18h at 37°C in buffered peptone water. Subsequently, 100 µL of the bacterial suspension were inoculated onto MacConkey agar supplemented with 1.5 µg/mL of cefotaxime and incubated aerobically overnight at 37°C. *E. coli* isolates were presumptively identified by phenotypic features, namely colony morphology and lactose-fermenting ability, and their identity was confirmed by screening for *gadA* gene by PCR, as previously described ¹⁵.

2.3.3. Antimicrobial Susceptibility Testing

The antimicrobial susceptibility testing was performed by disk diffusion method according to the guidelines of the Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, using the following antimicrobial-containing disks: 10 µg amoxicillin/clavulanic acid (Amc), 10 µg amoxicillin (Aml), 30 µg cefotaxime (Ctx), 30 µg ceftazidime (Caz), 30 µg cefoxitin (Fox) and 30 µg ceftiofur (Xnl) according to the Clinical Laboratory Standards Institute guidelines M31-A3 ¹⁶, M100-S22 ¹⁷ and recommendations of the French Microbiology Society for veterinary antimicrobial susceptibility testing ¹⁸. Phenotypic detection of ESBL was carried out by the double-disk synergy test ¹⁷. *E. coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection) was used as a quality control strain.

For extended phenotypic and genotypic characterization, 60 isolates obtained from 10 piglets, from each sow at each sampling moment were selected. Susceptibility to other antibiotics was also tested by disk diffusion method using disks containing 30 µg nalidixic acid (Na), 5 µg ciprofloxacin (Cip), 5 µg enrofloxacin (Enr), 25 µg sulfamethoxazole/trimethoprim (Sxt), 30 µg chloramphenicol (C), 30 µg florfenicol (Ffc), 200 µg fosfomycin (Fos), 300 µg nitrofurantoin (F), 10 µg gentamicin (Cn), 30 µg amikacin (Ak), 10 µg imipenem (Imp) and 10 µg meropenem (Mem) disks. The results were interpreted according to the abovementioned guidelines with the exception of florfenicol susceptibility, which was interpreted according to Keyes *et al.* ¹⁹.

2.3.4. Detection of Antimicrobial Resistance Genes

Bacterial isolates that grew in cefotaxime supplemented MacConkey agar were screened for *bla*_{CTX-M} type-encoding genes by PCR as previously described²⁰. The *bla*_{CTX-M} negative isolates were screened for other common ESBL genes, namely *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA} and *bla*_{SHV} type genes by a multiplex PCR, according to Pomba *et al.*²¹. Identification of the specific *bla*_{CTX-M} gene was carried out by DNA sequencing of the amplicon generated with primers designed for the *bla*_{CTX-M-I-group}²¹.

The detection of *mcr-1* to *-9* genes was performed in all isolates by three multiplex PCRs: one for screening *mcr-1* and *mcr-3*; the second for *mcr-2*, *mcr-4* and *mcr-5* and the third for *mcr-6* to *mcr-9*, using the primers described by Rebelo *et al.*²² and Borowiak *et al.*²³, with some PCR methodology modifications. The *mcr-10* was screened by simplex PCR using the in-house designed primers: *mcr-10_fw* [5'-ATTCCGTTTGTGCTGGTTGC-3'] and *mcr-10_rv* [5'-AACATACAGGGCACCGAGAC-3'] and the following conditions: a cycle of denaturation at 95°C for 60s, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30s, annealing at 58°C for 30s and elongation at 72°C for 60s, and a final cycle of elongation at 72°C for 10min. The expected *mcr-10* amplicon size was 707 base pairs. On *mcr-4*-positive isolates, we performed another *mcr-4* amplification using the external primers designed by Carattoli *et al.*²⁴ (Table 2.1). All the amplicons of *mcr* genes were sequenced on both strands (Stabvida, Portugal), and sequences were compared with those included in the GenBank database.

Table 2.1. Primers used in this study for detection of *gadA/B*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA-1}*, *ampC* and *mcr-1* to *-10* genes

Primer name	Sequence (5'-3')	Target gene	Amplicon size (bp)	Reference
<i>gadA/B_fw</i>	ACCTGCGTTGCGTAAATA	<i>gadA</i>	670	15
<i>gadA/B_rv</i>	GGGCGGGAGAAGTTGATG	<i>gadB</i>		
<i>CTX-M_fw</i>	TTTGCATGTGCAGTACCAGTAA	<i>bla_{CTX-M}</i> genes	544	20
<i>CTX-M_rv</i>	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA			
<i>TEM_fw</i>	TTCCTGTTTTTGTCTCACCCA	<i>bla_{TEM}</i>	716	
<i>TEM_rv</i>	TACGATACGGGAGGGCTTAC			
<i>SHV_fw</i>	TCAGCGAAAAACACCTTG	<i>bla_{SHV}</i>	471	21
<i>SHV_rv</i>	TCCCGCAGATAAATCACCA			
<i>OXA-1_fw</i>	TATCTACAGCAGCGCCAGTG	<i>bla_{OXA-1}</i>	199	
<i>OXA-1_rv</i>	CGCATCAAATGCCATAAGTG			
<i>ampC_fw</i>	CCCCGCTTATAGAGCAACAA	<i>ampC</i>	634	
<i>ampC_rv</i>	TCAATGGTCGACTTCACACC			
<i>mcr1_320bp_fw</i>	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	<i>mcr-1</i>	320	
<i>mcr1_320bp_rev</i>	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG			
<i>mcr2_700bp_fw</i>	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	<i>mcr-2</i>	715	
<i>mcr2_700bp_rev</i>	TCTAGCCCGACAAGCATAACC			
<i>mcr3_900bp_fw</i>	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	<i>mcr-3</i>	929	22
<i>mcr3_900bp_rev</i>	AATGGAGATCCCCGTTTTT			
<i>mcr4_1100bp_fw</i>	TCACTTTCATCACTGCGTTG	<i>mcr-4</i>	1116	
<i>mcr4_1100bp_rev</i>	TTGGTCCATGACTACCAATG			
<i>MCR5_fw</i>	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	<i>mcr-5</i>	1644	
<i>MCR5_rev</i>	TCATTGTGGTTGTCTTTTCTG			
<i>mcr-6_mp_fw</i>	AGCTATGTCAATCCCGTGAT	<i>mcr-6</i>	252	
<i>mcr-6_mp_rev</i>	ATTGGCTAGGTTGTCAATC			
<i>mcr-7_mp_fw</i>	GCCCTTCTTTTCGTTGTT	<i>mcr-7</i>	551	23
<i>mcr-7_mp_rev</i>	GGTTGGTCTCTTTCTCGT			
<i>mcr-8_mp_fw</i>	TCAACAATTCTACAAAGCGTG	<i>mcr-8</i>	856	
<i>mcr-8_mp_rev</i>	AATGCTGCGCAATGAAG			
<i>mcr-9_mp_fw</i>	TTCCCTTGTCTGGTTG	<i>mcr-9</i>	1011	
<i>mcr-9_mp_rev</i>	GCAGGTAATAAGTCGGTC			
<i>mcr-10_fw</i>	ATTCCGTTTGTGCTGGTTGC	<i>mcr-10</i>	707	This study
<i>mcr-10_rev</i>	AACATACAGGGCACCGAGAC			
<i>Mcr-4 ext FW</i>	ATCTGTAAAGTTTGTGGTGAC	complete	1820	24
<i>Mcr-4 ext RV</i>	TGAGAGCTAAATGTAACAATAGA	<i>mcr-4</i>		

2.3.5. Genetic Relatedness and Virulence Markers Detection

Genetic relatedness was evaluated in the isolates ($n=59$) from the 10 piglets selected for extended characterization by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis, following the PulseNet Protocol²⁵. Total DNA from *E. coli* isolates was digested using the *Xba*I restriction enzyme. The generated fragments were separated by PFGE using a CHEF-DR III System (Bio-Rad, San Diego, CA, USA, EUA). PFGE pattern analysis was performed with BioNumerics software v 4.61 (Applied Math, Ghent, Belgique) using Dice's coefficient and the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA dendrogram type). Pulsed-field type clusters and subtypes were assessed according to the settings recommended by Carriço et al. with a position tolerance of 1.7% for type classification and 2.5% for subtype, based on a similarity cut-off of $\geq 80\%$ ²⁶.

E. coli isolates were also classified into one of the four main phylogenetic groups A, B1, B2 and D, following the PCR-based technique described previously²⁷.

Plasmid incompatibility groups were identified among isolates by PCR-based replicon typing, using 18 pairs of primers²⁸.

A total of 8 pathogenicity island markers were screened by multiplex PCR^{29,30}; with a few modifications. Briefly, PCR assays were split in 3 separate multiplex assays: multiplex A for PAI III₅₃₆, PAI IV₅₃₆ and PAI II_{CFT073}; multiplex B1 for PAI II₉₆ and PAI I₅₃₆; and multiplex B2 for PAI II₅₃₆, PAI I_{CFT073} and PAI I₉₆.

2.4. Results

2.4.1. Occurrence of *bla*_{CTX-M} and *mcr* Type Genes and Other Resistance Genes in *E. coli*

From all sampling moments over five months of study, a total of 293 *E. coli* isolates grew in cefotaxime supplemented MacConkey agar and were screened for *bla*_{CTX-M}-type genes. At birth, *bla*_{CTX-M-IGroup} type genes were detected in 90% of sows ($n=9$) and 71% of piglets ($n=49$). Additionally, 10% of sows ($n=1$) and 5.36% of piglets ($n=3$) from different litters also carried the *mcr-I* gene. In the following four sampling moments of piglets, *bla*_{CTX-M} type genes were detected in 91.8% ($n=56$) after weaning, 57.62% ($n=34$) at the nursery unit, 71.42% ($n=40$) at the finishing unit and 97.36% ($n=37$) before leaving the finishing unit. The

mcr type-encoding genes were screened in 234 of 317 isolates. Only *mcr-1* and *mcr-4* were identified. The *mcr-1* gene was detected in 68.85% ($n=42$), 97.22% ($n=35$), 90% ($n=36$) and 8.10% ($n=3$) of isolates obtained after weaning, at the nursery, at the finishing unit and before leaving the finishing unit, respectively. The *mcr-4* gene was identified in 2 (3.3%), 10 (27.8%) and 3 (7.5%) of the isolates collected after weaning, at the nursery unit and at the finishing unit, respectively. Nucleotide sequencing of the *mcr-4* amplicons performed on both DNA strands revealed a new allele of the *mcr-4* gene. Compared to the prototype *mcr-4.1* gene (GenBank accession no. MF543359.1)²⁴, this new allele contains three missense mutations at positions 706 (G706T), 992 (A992G) and 1453 (G1453A) resulting in amino acid transitions Val236Phe, Gln331Arg and Val485Ile, respectively, as shown in Table 2.2. The sequence of this new allele, named *mcr-4.7*, is released at the NCBI GenBank under accession number ON586856.1. Figure 2.2 illustrates the prevalence of the *bla*_{CTX-M} type, the *mcr-1* and the *mcr-4* genes at each sampling moment.

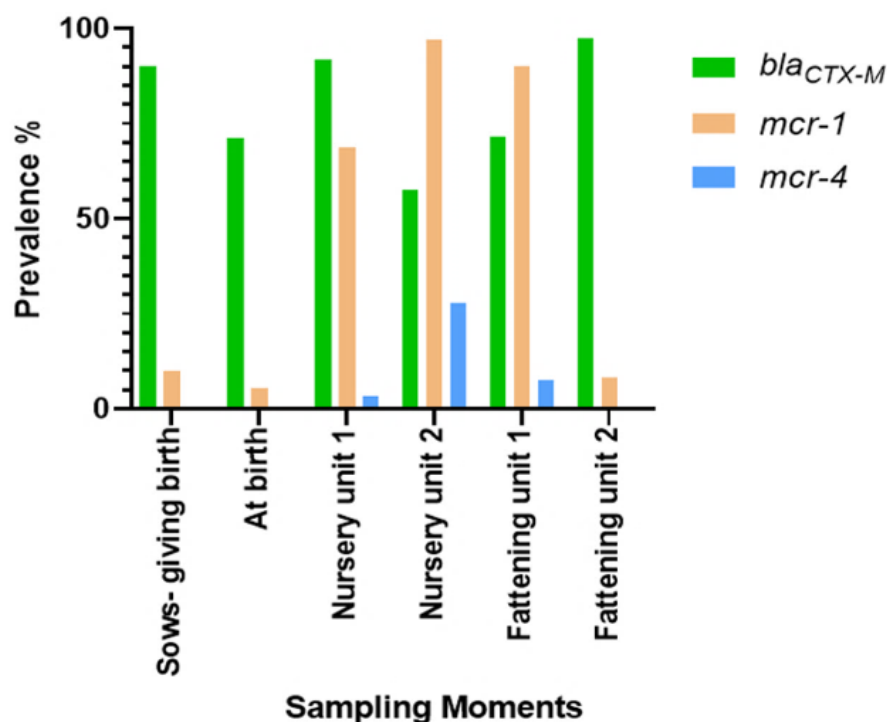


Figure 2.2. Prevalence of *bla*_{CTX-M} and *mcr*-producing *E. coli* throughout the piglets' life. The first sampling moment refers to the sows, when they give birth ($n = 10$). The following five sampling moments refer to the piglets from farrow-to-finish. At each sampling moment, *E. coli* isolates were selected by phenotypic features on cefotaxime supplemented MacConkey agar, and their identity was confirmed by *gadA* PCR, which led to obtaining a different number of isolates over the time of the study.

Remarkably, most *mcr*-positive isolates (96.7%) also carried *bla*_{CTX-M} type genes and 93.3% of *mcr-4* producing isolates also harboured the *mcr-1* gene. Furthermore, at birth, three *bla*_{CTX-M} positive isolates also showed cefoxitin resistance, and in one cefotaxime-resistant *bla*_{CTX-M} negative isolate, the *bla*_{TEM} type gene was detected instead.

Table 2.2. Nucleotide/amino acid changes in *mcr-4*/MCR-4 alleles.

Allele	Nucleotide Mutation						Amino acid changes	Accession no.
	329	536	613	706	992	1453		
4.1	C	T	C	G	A	G	—	MF543359
4.2	C	T	C	G	G	G	Gln331Arg	MG822663
4.3	C	G	C	T	A	G	Val179Gly, Val236Phe	MG026621
4.4	C	T	A	G	G	G	His205Asn, Gln331Arg	MG822665
4.5	T	T	C	G	G	G	Pro110Leu, Gln331Arg	MG822664
4.6	C	T	C	T	A	G	Val236Phe	MH423812
4.7	C	T	C	T	G	A	Val236Phe, Gln331Arg, Val485Ile	ON586856

2.4.2. Extended Phenotypic and Genotypic Characterization

2.4.2.1. Antimicrobial Resistance

A total of 60 isolates from 10 pigs were selected to test antibiotic susceptibility to drugs other than β -lactams. Overall, all isolates were susceptible to amoxicillin/clavulanic acid combination, fosfomicin, amikacin and to carbapenems; in contrast, they were resistant to amoxicillin, cefotaxime and ceftiofur. A total of 22 different resistance patterns were found in the farm during the period of study. The most frequently detected pattern (17 isolates) comprised resistance to amoxicillin, cefotaxime, and ceftiofur, followed by the amoxicillin, cefotaxime, ceftazidime, ceftiofur, sulfamethoxazole/trimethoprim, chloramphenicol, florfenicol and gentamicin resistance pattern, detected in 7 isolates. Table 2.3 shows the number of different resistance patterns, as well the most prevalent antimicrobial resistance profile found in each of the six sampling moments.

Table 2.3. Characteristics of *bla*_{CTX-M} producing *E. coli* isolates recovered from piglets from a Portuguese farms over 5 sampling moments.

Sampling Moment	n	<i>bla</i> _{CTX-M} Gene		<i>mcr</i> Gene	Phylogenetic Group				PAI Marker Profile	Number of Resistance Patterns	Antimicrobial Resistance Profile ^a	
		<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-32}		<i>mcr-1</i>	A	B1	B2				D
At birth	10	5	5	0	0	4	5	0	0	1	IV ₅₃₆ (2)	AmlCtxXnlSxt (3)
Nursery 1	10	5	5	7	0	2	5	2	0	1	-	AmlCtxXnl (2) AmlCtxXnlNaEnrCFfcCn (2)
Nursery 2	10	3	7	10	2	0	10	0	0	0	IV ₅₃₆ (3)	AmlCtxXnlNaCCn (2) AmlCtxXnlNaCipEnrSxtCCn (2)
Fattening unit 1	10	1	9	9	1	0	10	0	0	0	IV ₅₃₆ (3)	AmlCtxXnlCazSxtCFfcCn (6)
Fattening unit 2	10	8	2	1	0	3	7	0	0	0	-	AmlCtxXnl (7)

Abbreviations: Aml, amoxicillin; Ctx, cefotaxime; Xnl, Ceftiofur; Sxt, Sulfamethoxazole/trimethoprim; Ffc, Florfenicol; Na, Nalidixic acid; Enr, Enrofloxacin; C, Chloramphenicol; Cn, Gentamicin; Cip, Ciprofloxacin; Caz, Ceftazidime; Fox, Cefoxitin; F, Nitrofurantoin; ^a most frequent antimicrobial resistance profile; n=number of positive *bla*_{CTX-M} producing *E. coli* isolates (n_{total}=60); NT=not typeable.

2.4.2.2. Identification of *bla*_{CTX-M} Genes and Plasmid Incompatibility Groups

Nucleotide sequencing of 60 *bla*_{CTX-M} type genes revealed that 32 *E. coli* isolates carried *bla*_{CTX-M-1} (53.33%), and 28 carried *bla*_{CTX-M-32} (46.67%) (Table 2.3). Additionally, by using PCR-based replicon typing, plasmids were assigned to IncII, IncF, and IncN groups, the latter being the least frequent. In *bla*_{CTX-M-32}-carrying isolates, IncF plasmids were detected in 19, followed by IncII plasmids ($n=8$) and IncN plasmids ($n=1$), while in *bla*_{CTX-M-1}-carrying isolates IncII plasmids ($n=21$) was more prevalent, followed by IncF ($n=8$) and IncN ($n=3$) plasmids.

Otherwise, IncF ($n=15$) and IncII ($n=12$) plasmids were identified in *mcr-1*-carrying isolates, while IncF ($n=2$) and IncII ($n=1$) plasmids were detected in the new allele *mcr-4*-harbouring isolates.

2.4.2.3. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

The clonal relationship of 59 *E. coli* isolates from piglets over the five sampling moments was assessed by PFGE. Different genetic profiles were observed and 16 genetic clusters were found. The dendrogram analysis showed that genetically closely related isolates were maintained through the different stages of piglets' life (Figure 2.3).

2.4.2.4. Pathogenicity Island Markers and Phylogenetic Analysis

Strain virulence was inferred by detection of pathogenicity islands and phylogeny.

PAI markers were detected in nine isolates (15.0%) as shown in Table 2.3. Notably, one isolate carried both PAI IV₅₃₆ and PAI I_{CFT073} markers, while the other eight isolates only carried PAI IV₅₃₆ marker. The other PAI markers targeted by this study were not detected in any of the isolates.

These *E. coli* isolates were allocated into four phylogenetic groups. The B1 phylogenetic group was the most prevalent ($n=45$; 75.0%), followed by group A ($n=10$; 16.67%). The phylogenetic group B2 and D was only found in two (3.33%) and one (1.67%) isolates, respectively.

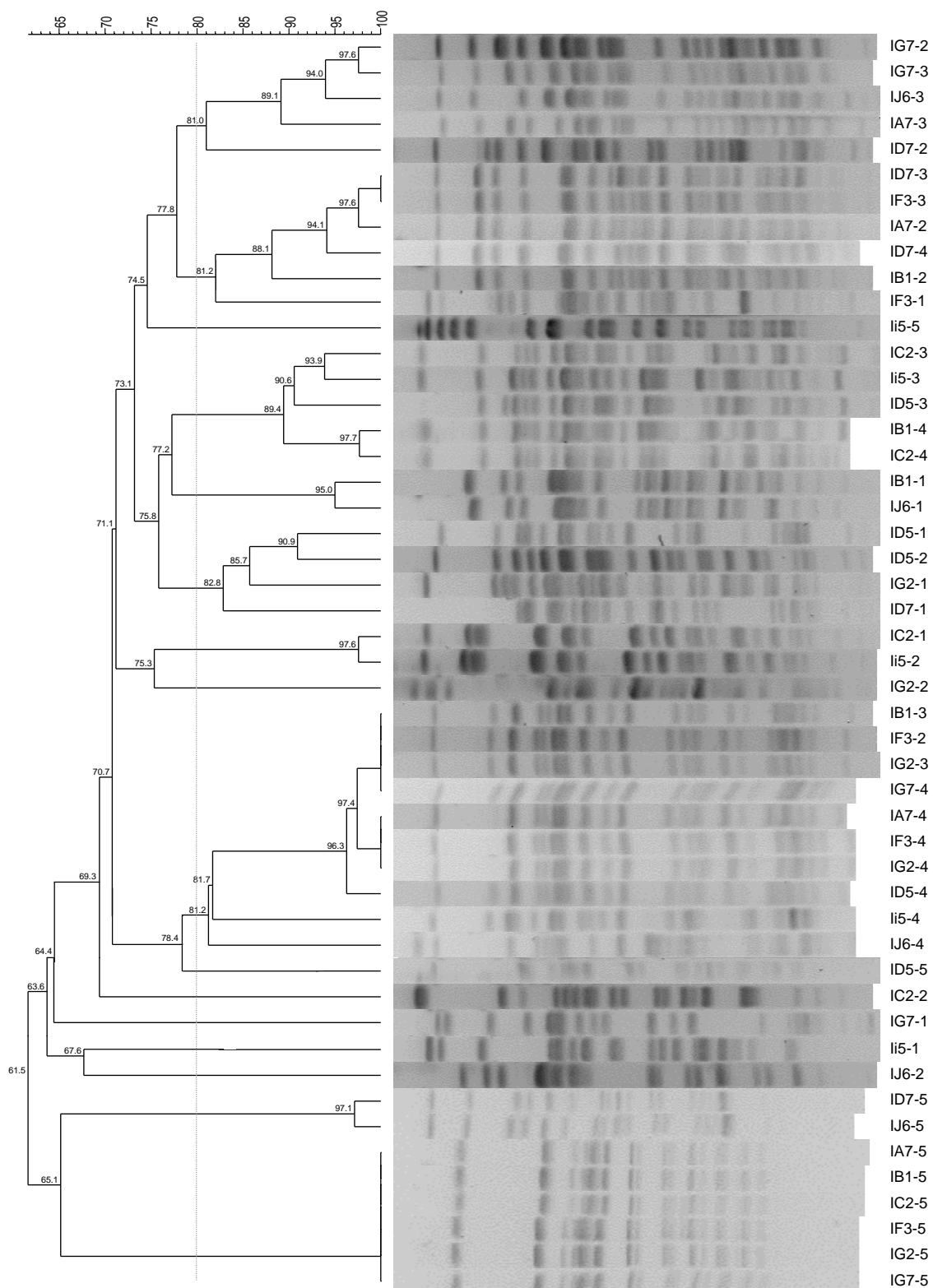


Figure 2.3. Dendrogram of clonal relationship of *E. coli* isolates from piglets over the five sampling moments.

2.5. Discussion

This study describes the characterization of *E. coli* strains from pigs in an intensive farm production setting from birth to finishing, using both phenotypic and genotypic methods to characterize and study the dynamics of resistant *E. coli* persistence and dissemination at animal level in livestock production.

A high prevalence of *bla*_{CTX-M} genes was found in *E. coli* throughout the piglet's life cycle in the Portuguese farm included in this study. Similar data were reported from diverse intensive farming production from diverse European countries where, likewise, ceftiofur was used as prophylactic treatment³¹⁻³⁴. In this study, *bla*_{CTX-M-1} was the most prevalent gene, followed by *bla*_{CTX-M-32}, which is in agreement with other studies conducted in Europe^{35,36}.

The colistin-resistant *mcr*-genes screening revealed a high prevalence of the *mcr-1* gene. In fact, the *mcr-1* gene has been widely reported in *E. coli* strains from food-producing animals, mainly from the pig reservoir^{5,22,24,37,38}. Although *mcr-4* was firstly described in 2017²⁴ in pig samples, in our study *mcr-4* was detected mainly in *mcr-1*-producing *E. coli* strains isolated in 2011. To our knowledge, this is the first time the *mcr-4* gene is reported in Portugal. Moreover, the sequencing of the gene revealed a new *mcr-4* allele, which contains three point mutations when compared with the *mcr-4.1* allele²⁴. Some point mutations were previously described; however, this is the first report of the mutation at position 1453, which results in the change of amino acid 485 due to the substitution of a valine for an isoleucine^{39,40}.

There are only a few reports of co-occurrence of *mcr-1* and *mcr-4*, but they are all from swine isolates from Spain^{22,37,41,42}. Thus, this is the first report of *E. coli* isolates harbouring *bla*_{CTX-M-32} or *bla*_{CTX-M-1}, *mcr-1* and *mcr-4* recovered from Portuguese piglets.

In this study, a high prevalence of *bla*_{CTX-M} genes was found both in the newborn piglets before ceftiofur administration and in sows when they give birth. This finding suggests that vertical transmission of the resistant bacteria from sows to the offspring has occurred. Transmission of bacteria during perinatal period remains unclear. However, some studies showed that primary colonisation of newborn piglets' gut is influenced by the mother and the environmental microbiota in the farrowing unit^{43,44}. The maintenance of resistant *E. coli* during all stages of the piglet's lives and the increased levels of *bla*_{CTX-M} at the nursery unit I

may be due to the prophylactic administration of ceftiofur to all piglets immediately after birth, highlighting the need of alternative practices to prevent young animal infections. Similarly, high levels of prevalence of *mcr* genes were observed during the after weaning, at the nursery and at the finish units. In this farm, colistin was administered for post weaning diarrhoea that may affect piglets during the after weaning period, associated with intestinal dysbiosis and proliferation of enterotoxigenic *E. coli*. Therefore, colistin pressure may be responsible for the emergence of *mcr* genes, since in the first sampling moments and in the sows, these genes were present at low rates. The levels of *mcr* genes tended to be less frequent as time after treatment progresses. Thus in the beginning of the fattening period, a small reduction in the prevalence of the *mcr* genes was observed and a sharp decrease in this prevalence was found before leaving the finish unit. Finally, it is important to note that the detection of these resistance genes was performed in the isolates obtained after selective culturing with cefotaxime and not with colistin. Therefore, the prevalence of *mcr* genes in this study may be underestimated.

The use of ceftiofur was not only associated with amoxicillin and cefotaxime resistance but also with structurally unrelated antimicrobials such as chloramphenicol⁴⁵. In this study, resistance to chloramphenicol was observed in 35 isolates of piglets (58.33%), despite no phenicols being used in the early stages of the piglets' lives. Indeed, in previously reported studies, chloramphenicol resistance genes have often been found on the same ESBL encoding plasmids⁴⁵⁻⁴⁹.

The *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-32} detected in this study were likely located on IncII, IncF and IncN plasmids, which means that one ESBL-type gene is possibly mobilized by different incompatibility plasmids, and at the same time one incompatibility plasmid group can possibly carry different ESBL-type genes. The association of *bla*_{CTX-M} type genes and the conjugative plasmids of incompatibility groups A/C, F, HI, II, L and N has been observed. In fact, *bla*_{CTX-M-1}-carrying Inc N, Inc F and IncII plasmids are strongly associated with *Enterobacteriales* isolated from animal sources and these plasmids play a major role in dissemination of these antimicrobial resistance genes among the bacteria population⁵⁰. Beyond the resistance transfer, we aimed to understand whether the same strains were maintained along the pig life cycle. Indeed, the same *E. coli* clones were found in different sampling moments, from the sows to the finishing unit, showing the maintenance of the resistant and virulent isolates throughout a pig's life cycle and demonstrating that piglets

not only acquire *E. coli* clones from their mothers but also act as active carriers of possibly plasmid-borne *bla*_{CTX-M} type and *mcr* *E. coli* strains.

The majority of *E. coli* isolates were allocated into the B1 phylogenetic group, which includes intestinal pathogenic strains with increased ability to persist in the environment⁵¹. The B1 phylogenetic group is usually considered less virulent than strains from the phylogenetic groups B2 and D⁴⁹. However, in this study nine *E. coli* isolates carry one or more PAI markers. PAI IV₅₃₆ encoding for the yersiniabactin iron-uptake system was the most frequently detected, which is in concordance with previous studies reporting PAI IV₅₃₆ as the most ubiquitous in *Enterobacteriales*^{29,52}. Often it is detected together with PAI I_{CFT07}⁵⁰. However, PAI IV₅₃₆ was mostly detected alone in this study, mostly in B1 phylogenetic group. This high frequency of PAI IV₅₃₆ in commensal isolates has led to the suggestion that PAI IV₅₃₆ may be a fitness island rather than a pathogenicity one²⁹. From our point of view, the carriage of siderophore, a virulence factor, will increase the fitness of the bacteria, and it will contribute to the maintenance of potential pathogenic strains along the productive cycle of pigs that, ultimately, may enter in food chain.

2.6. Conclusions

Overall, a high proportion of sows and their piglets were colonized by ESBL/*mcr*-producing *E. coli*. The results of this longitudinal study showed that the use of antibiotics in intensive animal production in the early stages of life, namely ceftiofur and colistin, exert a high selective pressure in pig gut microbiota, and as such contributing to the high prevalence and co-selection of *bla*_{CTX-M-I Group} and *mcr-1* and/or *-4* genes in *E. coli* strains and promoting the maintenance of resistant and virulent strains throughout the pig life cycle, potentially reaching humans through the food chain. This highlights the importance of antimicrobial stewardship during all stages of a production animal's life as a possible tool to achieve a reduction of the burden of multidrug-resistant and virulent isolates.

2.7. References

1. Nabarro D, Wannous C. The potential contribution of livestock to food and nutrition security: the application of the One Health approach in livestock policy and practice. *Revue scientifique et technique*. 2014;33(2):475-85. doi:10.20506/rst.33.2.2292
2. Thornton PK. Livestock production: recent trends, future prospects. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2010;365(1554):2853-67. doi:10.1098/rstb.2010.0134
3. Sevilla E, Vico JP, Delgado-Blas JF, et al. Resistance to colistin and production of extended-spectrum beta-lactamases and/or *AmpC* enzymes in *Salmonella* isolates collected from healthy pigs in Northwest Spain in two periods: 2008-2009 and 2018. *International journal of food microbiology*. 2021;338:108967. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108967
4. World Health Organization (WHO). Critically important antimicrobials for human medicine - 6th revision. 2019.
5. Lima T, Domingues S, Da Silva GJ. Manure as a Potential Hotspot for Antibiotic Resistance Dissemination by Horizontal Gene Transfer Events. *Veterinary sciences*. 2020;7(3). doi:10.3390/vetsci7030110
6. Moodley A, Guardabassi L. Transmission of IncN plasmids carrying *bla_{CTX-M-1}* between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(4):1709-11. doi:10.1128/AAC.01014-08
7. Lima T, Domingues S, Da Silva GJ. Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. *Microorganisms*. 2019;7(2). doi:10.3390/microorganisms7020055
8. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2011;70(1):119-23. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002
9. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(2):161-8. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7
10. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2020;75(11):3087-3095. doi:10.1093/jac/dkaa205
11. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of Beta-Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical microbiology reviews*. 2020;33(2). doi:10.1128/CMR.00047-19
12. European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA journal European Food Safety Authority*. 2020;18(3):e06007. doi:10.2903/j.efsa.2020.6007
13. Bennani H, Mateus A, Mays N, Eastmure E, Stark KDC, Hasler B. Overview of Evidence of Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in the Food Chain. *Antibiotics*. 2020;9(2). doi:10.3390/antibiotics9020049

14. Eurostat: Statistics Explained. Agricultural production - livestock and meat. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural_production_-_livestock_and_meat
15. McDaniels AE, Rice EW, Reyes AL, Johnson CH, Haugland RA, Stelma GN, Jr. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. *Applied and environmental microbiology*. 1996;62(9):3350-4. doi:10.1128/AEM.62.9.3350-3354.1996
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. CLSI document M31-A3*. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 22nd Informational Supplement. CLSI document M100-S22*. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012.
18. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). *Antibiogramme vétérinaire du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*. 2013.
19. Keyes K, Hudson C, Maurer JJ, Thayer S, White DG, Lee MD. Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44(2):421-4. doi:10.1128/aac.44.2.421-424.2000
20. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(12):3724-32. doi:10.1128/aac.47.12.3724-3732.2003
21. Pomba C, Mendonca N, Costa M, et al. Improved multiplex PCR method for the rapid detection of beta-lactamase genes in *Escherichia coli* of animal origin. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2006;56(1):103-6. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.03.005
22. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2018;23(6). doi:10.2807/15607917.ES.2018.23.6.17-00672
23. Borowiak M, Baumann B, Fischer J, et al. Development of a Novel *mcr-6* to *mcr-9* Multiplex PCR and Assessment of *mcr-1* to *mcr-9* Occurrence in Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Isolates From Environment, Feed, Animals and Food (2011-2018) in Germany. *Frontiers in microbiology*. 2020;11:80. doi:10.3389/fmicb.2020.00080
24. Carattoli A, Villa L, Feudi C, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2017;22(31). doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589
25. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne pathogens and disease*. 2006;3(1):59-67. doi:10.1089/fpd.2006.3.59

26. Carrico JA, Pinto FR, Simas C, et al. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(11):5483-90. doi:10.1128/JCM.43.11.5483-5490.2005
27. Doumith M, Day MJ, Hope R, Wain J, Woodford N. Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(9):3108-10. doi:10.1128/JCM.01468-12
28. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of microbiological methods*. 2005;63(3):219-28. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018
29. Sabaté M, Moreno E, Perez T, Andreu A, Prats G. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006;12(9):880-6. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01461.x
30. Bronowski C, Smith SL, Yokota K, et al. A subset of mucosa-associated *Escherichia coli* isolates from patients with colon cancer, but not Crohn's disease, share pathogenicity islands with urinary pathogenic *E. coli*. *Microbiology*. 2008;154(Pt 2):571-583. doi:10.1099/mic.0.2007/013086-0
31. Zelendova M, Dolejska M, Masarikova M, et al. CTX-M-producing *Escherichia coli* in pigs from a Czech farm during production cycle. *Letters in applied microbiology*. 2020;71(4):369-376. doi:10.1111/lam.13331
32. Cavaco LM, Abatih E, Aarestrup FM, Guardabassi L. Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(10):3612-6. doi:10.1128/AAC.00354-08
33. Jorgensen CJ, Cavaco LM, Hasman H, Emborg HD, Guardabassi L. Occurrence of CTX-M-I-producing *Escherichia coli* in pigs treated with ceftiofur. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;59(5):1040-2. doi:10.1093/jac/dkm075
34. Dolejska M, Matulova M, Kohoutova L, Literak I, Bardou J, Cizek A. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in turkey meat production farms in the Czech Republic: national survey reveals widespread isolates with *bla*_(SHV-12) genes on IncFII plasmids. *Letters in applied microbiology*. 2011;53(3):271-7. doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03099.x
35. Jakobsen L, Bortolaia V, Bielak E, et al. Limited similarity between plasmids encoding CTX-M-I beta-lactamase in *Escherichia coli* from humans, pigs, cattle, organic poultry layers and horses in Denmark. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2015;3(2):132-136. doi:10.1016/j.jgar.2015.03.009
36. Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, Endimiani A. Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2013;16(1-2):22-45. doi:10.1016/j.drug.2012.12.001

37. Garcia-Menino I, Diaz-Jimenez D, Garcia V, et al. Genomic Characterization of Prevalent *mcr-1*, *mcr-4*, and *mcr-5* *Escherichia coli* Within Swine Enteric Colibacillosis in Spain. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:2469. doi:10.3389/fmicb.2019.02469
38. Kieffer N, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Poirel L. High Rate of MCR-1-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among Pigs, Portugal. *Emerging infectious diseases*. 2017;23(12):2023-2029. doi:10.3201/eid2312.170883
39. Chavda B, Lv J, Hou M, et al. Co-identification of *mcr-4.3* and *bla_{NDM-1}* in a Clinical Enterobacter cloacae Isolate from China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018;62(10). doi:10.1128/AAC.00649-18
40. Partridge SR, Di Pilato V, Doi Y, et al. Proposal for assignment of allele numbers for mobile colistin resistance (*mcr*) genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018;73(10):2625-2630. doi:10.1093/jac/dky262
41. Garcia V, Garcia-Menino I, Mora A, et al. Co-occurrence of *mcr-1*, *mcr-4* and *mcr-5* genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006-2017). *International journal of antimicrobial agents*. 2018;52(1):104-108. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.03.022
42. Gallardo A, Iglesias MR, Ugarte-Ruiz M, et al. Plasmid-mediated *Kluyvera*-like *arnBCADTEF* operon confers colistin (hetero)resistance to *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2021. doi:10.1128/AAC.00091-21
43. Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand*. 2017;59(1):31. doi:10.1186/s13028-017-0299-7
44. Burow E, Rostalski A, Harlizius J, et al. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment. *Prev Vet Med*. 2019;165:52-62. doi:10.1016/j.prevetmed.2019.02.008
45. Misumi W, Funamori T, Hamada K, et al. Association between antimicrobial treatment and resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased swine in Kagoshima Prefecture, Japan. *The Journal of veterinary medical science*. 2021;83(3):358-369. doi:10.1292/jvms.20-0338
46. Freitag C, Michael GB, Kadlec K, Hassel M, Schwarz S. Detection of plasmid-borne extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. *Veterinary microbiology*. 2017;200:151-156. doi:10.1016/j.vetmic.2016.08.010
47. Meunier D, Jouy E, Lazizzera C, et al. Plasmid-borne florfenicol and ceftiofur resistance encoded by the *floR* and *bla_{CMY-2}* genes in *Escherichia coli* isolates from diseased cattle in France. *Journal of medical microbiology*. 2010;59(Pt 4):467-471. doi:10.1099/jmm.0.016162-0
48. Rehman MA, Yin X, Lepp D, et al. Genomic Analysis of Third Generation Cephalosporin Resistant *Escherichia coli* from Dairy Cow Manure. *Veterinary sciences*. 2017;4(4). doi:10.3390/vetsci4040057
49. Harada K, Asai T, Ozawa M, Kojima A, Takahashi T. Farm-level impact of therapeutic antimicrobial use on antimicrobial-resistant populations of *Escherichia coli* isolates from pigs. *Microbial drug resistance*. 2008;14(3):239-44. doi:10.1089/mdr.2008.0836

50. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018;73(5):1121-1137. doi:10.1093/jac/dkx488
51. Carlos C, Pires MM, Stoppe NC, et al. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC microbiology*. 2010;10:161. doi:10.1186/1471-2180-10-161
52. Li B, Sun JY, Han LZ, Huang XH, Fu Q, Ni YX. Phylogenetic groups and pathogenicity island markers in fecal *Escherichia coli* isolates from asymptomatic humans in China. *Applied and environmental microbiology*. 2010;76(19):6698-700. doi:10.1128/AEM.00707-10

CAPÍTULO III

Occurrence and Biological Cost of *mcr-I*-Carrying Plasmids Co-harboured Beta-Lactamase Resistance Genes in Zoonotic Pathogens from Intensive Animal Production

O conteúdo deste capítulo encontra-se publicado como:

Artigo científico

- Tiago Lima, Dina Loureiro, Ana Henriques, Fernando Ramos, Constança Pomba, Sara Domingues, Gabriela Jorge da Silva. Occurrence and Biological Cost of *mcr-I*-Carrying Plasmids Co-harboured Beta-Lactamase Resistance Genes in Zoonotic Pathogens from Intensive Animal Production. **Antibiotics** 2022; 11(10), 1356. doi: 10.3390/antibiotics11101356

3.1. Abstract

Colistin is classified as a high-priority critical antimicrobial by the World Health Organization (WHO). A better understanding of the biological cost imposed by *mcr*-plasmids is paramount to comprehending their spread and may facilitate the decision about the ban of colistin in livestock. This study aimed to assess the prevalence of *mcr* and ESBL genes from 98 *Escherichia coli* and 142 *Salmonella enterica* isolates from food-producing animals and the impact of the *mcr-I* acquisition on bacterial fitness. Only *mcr-I* was identified by multiplex PCR (*mcr-I* to *mcr-10*) in 15.3% of *E. coli*. Colistin MICs ranged between 8-32 mg/L. In four isolates, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-1}, and *bla*_{CTX-M-15} co-existed with *mcr-I*. The IncHI2, IncHII, IncP, IncN, and IncI plasmids were transferred by conjugation to *E. coli* J53 at frequencies of 10⁻⁷ to 10⁻² cells/recipient. Growth kinetics assays showed that transconjugants had a significantly lower growth rate than the recipient (*p*<0.05), and transconjugants' average growth rate was higher in the absence than in the presence of colistin (1.66 versus 1.32 (*p*=0.0003)). Serial transfer assay during 10 days demonstrated that plasmid retention ranged from complete loss to full retention. Overall, *mcr-I*-bearing plasmids impose a fitness cost, but the loss of plasmids is highly variable, suggesting that other factors beyond colistin pressure regulate the plasmid maintenance in a bacterial population, and colistin withdrawal will not completely lead to a decrease of *mcr-I* levels.

Keywords: colistin resistance; *mcr-I*; CTX-M; fitness cost; conjugation; livestock.

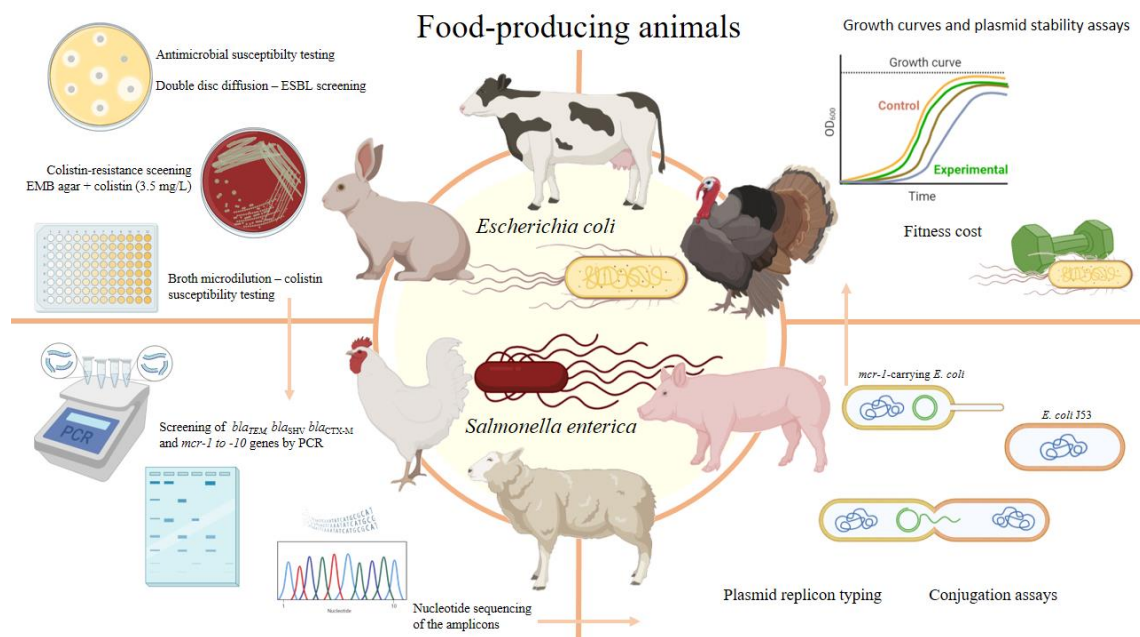


Figure 3.1. Chapter graphical abstract.

3.2. Introduction

Extensive use and misuse of antimicrobial agents are recognised as the most important causes of the emergence and selection of antimicrobial resistance worldwide. Nowadays, antimicrobial resistance has been widely considered a global threat to human and animal health and should be seen from a One Health perspective ^{1,2}.

In veterinary medicine and intensive animal farm production, the overuse of antibiotics with therapeutic, prophylactic, and metaphylactic purposes led to the emergence of important clinical resistance genes, such as extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and mobilised colistin resistance (*mcr*) genes, in bacteria of animal origin that may enter in the food chain and/or spread into the environment ³. There are several reports of the prophylactic administration of cephalosporins in intensive pig production to prevent neonatal infections, namely *Streptococcus suis* infections, navel infections, arthritis and colibacillosis diarrhoea ⁴. Colistin is approved in pig production in some countries for the control of *Enterobacteriaceae* infections, particularly for those caused by *Escherichia coli* ⁵. In addition, according to the European Medicines Agency report, colistin should only be used for therapy or metaphylaxis purposes in food-producing animals ⁶. However, according to the recommendations for the prudent and responsible use of antibiotics used in animals, colistin should have its use restricted and, whenever possible, its use should be based on antimicrobial susceptibility tests, given its extreme importance in human medicine thus following a One Health approach ⁷.

The first report of ESBL-producing bacteria was in 1980, shortly after the introduction of the third-generation cephalosporins in clinical practice. Nowadays, there are several types of ESBL that promote resistance to all beta-lactams, except carbapenems. The most widespread are the ESBL types generated due to point mutations in the classical penicillinases SHV-1/2, TEM-1/2 and the CTX-M family beta-lactamases ⁸.

The lack of effective antibiotics in human medicine, particularly to fight carbapenemase-producing *Enterobacterales*, led to a renewed interest in the old antibiotic colistin, which became one of the last-resort therapeutic options ⁹. Colistin, also known as polymyxin E, was used in human medicine several decades ago, but it was banned due to its neurotoxicity and nephrotoxicity. In contrast, it has been widely used in animal production practice in

numerous countries for therapeutic, prophylactic and growth promotion purposes, mostly in pigs, poultry and cattle, due to its efficiency and low cost ¹⁰.

The prevalence of colistin resistance has been gradually reported in the last few years, and understanding the underlying resistance mechanisms is a priority ¹¹. Colistin resistance is mainly associated with LPS structure modifications, with consequent reduced or absent affinity to colistin ¹⁰. Until 2015, all known colistin resistance mechanisms were chromosomally encoded as a result of specific mutations that led to an overexpression of LPS-modifying genes ¹². Then, the first plasmid-mediated colistin resistance gene (*mcr-1*) was identified in *E. coli* isolates from pigs' samples, retail meat and human clinical isolates in China. The *mcr* gene encodes a phosphoethanolamine transferase that adds a phosphoethanolamine group to Lipid A, leading to decreased binding of colistin to LPS ¹³. Since then, *mcr-1* homologs (*mcr-1* to *mcr-10*) and several variants have been identified worldwide in diverse Gram-negative bacteria of different origins, mainly associated with food-producing animals ^{10,14-17}.

It is generally assumed that antibiotic resistance by the acquisition of mobile genetic elements, like plasmids, confers a reduction in the fitness of the recipient cell that is expressed as reduced growth rates, lower virulence, lower transmission rates or less invasiveness ¹⁸. However, the fitness cost is strongly dependent on the plasmid backbone and on the host cell type ¹⁹. In addition, plasmids may harbour diverse resistance genes, which under the selective pressure of antibiotic treatment, may result in co-selection of the plasmid-carrying multiple resistance genes ²⁰.

The co-occurrence of ESBL and *mcr* genes has been reported ^{4,15,16}. Their dissemination is fuelled by horizontal gene transfer mechanisms, such as conjugation, which may spread to pathogenic Gram-negative bacteria, further limiting the treatment options ^{10,21}. Therefore, the surveillance and molecular characterization of colistin resistance in zoonotic pathogens play a key role in the need to decide on restrictions on antibiotic use in animal production ²². Moreover, understanding the biological cost of the acquisition of *mcr*-carrying plasmids is important to infer their stability in the host and dissemination.

The aim of this study was to assess the prevalence of *mcr* and ESBLs genes in *E. coli* and *Salmonella enterica* isolates, two well-known zoonotic pathogens, collected from intensive farming animals and farm environments, to assess the potential of horizontal dissemination of these genes and to evaluate the impact of *mcr-1* acquisition in the fitness of the host.

3.3. Materials and Methods

3.3.1. Bacterial Isolates

Ninety-eight *E. coli* and 142 *S. enterica* isolates were collected from animals of intensive farming production and farmer's boots between January 2016 and April 2018 by ALS-Controlvet (Tondela, Portugal). These isolates were collected from swine, poultry, rabbit, sheep and bovine from Portugal and Spain. All *S. enterica* isolates were serotyped accordingly to the Kauffmann-White scheme ²³.

3.3.2. Antimicrobial Susceptibility Testing

The antimicrobial susceptibility testing was performed by the disc diffusion method with the antibiotics: amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, apramycin, cefalexin, ceftiofur, doxycycline, erythromycin, enrofloxacin, florfenicol, flumequine, lincomycin/spectinomycin, nalidixic acid, neomycin, oxolinic acid, pipemidic acid, spiramycin, tetracycline, tiamulin, tilmicosin and trimethoprim/sulfamethoxazole (Oxoid, Basingstoke, UK), according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines (EUCAST) ²⁴. Phenotypic detection of ESBL was performed by the double disc diffusion method with amoxicillin/clavulanic acid, aztreonam, ceftazidime and cefotaxime disks (Oxoid, Basingstoke, UK). The data were interpreted according to the EUCAST guidelines ²⁴.

Screening of colistin-resistant isolates was performed according to a previously described method, with some modifications ²⁵. The SuperPolymyxin[®] medium was developed for this purpose. However, our study was performed only with Gram-negative bacteria, and so neither amphotericin B nor daptomycin was used. Therefore, bacterial growth was observed in EMB agar (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) supplemented with 3.5 mg/L of colistin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) after 24 and 48h of incubation. Colistin susceptibility was evaluated by the broth microdilution method, according to EUCAST recommendations ²⁴, determining the minimal inhibitory concentrations (MICs) both for wild strains and transconjugants.

3.3.3. Detection of Antimicrobial Resistance Genes

Screening of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} type genes was performed by PCR with specific primers, as previously reported ²⁶. Bacterial isolates that grew in colistin-supplemented EMB agar were screened for *mcr-1* to *mcr-10* genes. PCR screening for *mcr-1* to *-5* was carried out using the multiplex PCR protocol, according to Rebelo *et al.*, with some alterations ²⁷. Briefly, the multiplex PCR was divided into two: one for screening *mcr-1* and *mcr-3* and the second for *mcr-2*, *mcr-4* and *mcr-5*. Screening of *mcr-6* to *-9* genes was performed according to Borowiak *et al.* ²⁸, and *mcr-10* was screened by simplex PCR using the in-house designed primers: *mcr-10_fw* [5'-ATTCCGTTTGTGCTGGTTGC-3'] and *mcr-10_rv* [5'-AACATACAGGGCACCGAGAC-3'] and the following conditions: initial denaturation at 95°C for 60s, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30s, annealing at 58°C for 30s and elongation at 72°C for 60s, and a final cycle of elongation at 72°C for 10 min. The *mcr-10* amplicon size was 707 base pairs.

Identification of the resistance genes was confirmed by nucleotide sequencing of the amplicons (Stabvida, Caparica, Portugal).

3.3.4. Conjugation Assay and Plasmid Replicon Typing

Conjugation experiments were performed to determine the transferability of *mcr* genes using sodium azide-resistant *E. coli* J53 as a recipient strain at a bacterial cell ratio 1:10. Transconjugants were selected on Mueller Hinton (MH) Agar (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) plates supplemented with sodium azide (150 mg/L; Scharlab, Barcelona, Spain) and colistin (2 mg/L). The success of conjugation was further confirmed by *mcr-1*-PCR detection and colistin susceptibility testing by the microdilution method in transconjugants. Conjugation frequency (CF) was determined as the number of transconjugants per recipient cell.

Incompatibility groups were identified among *mcr-1*-borne plasmids carried by transconjugants by PCR-based replicon typing, using eighteen pairs of primers, as previously described ²⁹.

3.3.5. Determination of Growth Rates

Growth rates of *E. coli* J53 and 14 transconjugants carrying the *mcr-I*-bearing IncH12, IncH11, IncP IncN, IncI₁, FIB plasmids and *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-15} genes were evaluated by measuring the optical density (OD) at 600 nm. Bacterial strains were inoculated in antibiotic-free and in 4 mg/L colistin-containing Luria-Bertani (LB) broth (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) at a 1:100 ratio. Bacterial growth was recorded by monitoring OD₆₀₀ every 30 min for seven h and then at 8, 9, 10, 12, 24 and 30h. The kinetics is expressed in a specific growth rate constant (μ).

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 software (GraphPad San Diego, CA, USA). The differences were assessed using paired, two-tailed *t*-test and ANOVA test. *p*-values <0.05 were considered statistically significant.

3.3.6. Plasmid Stability Assay

The stability of *mcr-I*-borne plasmids was investigated in vitro, as previously described³⁰. Briefly, 10 μ L of overnight cultures of six transconjugants and their donors were inoculated in 10 mL of antibiotic-free LB broth (1:1000 ratio). Sub-culturing was performed after 24h of incubation at 37°C in an orbital shaker at 120 rpm and repeated for 10 consecutive days. Each day, the culture broths were serially diluted and plated both onto antibiotic-free and 4 mg/L colistin-containing MH agar once 8 mg/L was the lowest MIC value found among these strains.

The percentage of plasmid retention was calculated by dividing the number of colonies on colistin-containing MH agar by the number of colonies on antibiotic-free MH agar.

3.4. Results

3.4.1. Origin of Bacterial Isolates and Antimicrobial Susceptibility Test

A total of 240 bacterial isolates were collected: 142 *S. enterica* and 98 *E. coli* from different sources (Tables 3.1 and 3.2) and from diverse Portuguese and Spain regions. The majority of the isolates were from poultry (Table 1). *S. enterica* serovar Typhimurium was the most prevalent serotype detected, followed by the serovar Enteritidis in poultry. Sixty-eight (47.9%) *S. enterica* isolates were recovered from the farm environment and one from animal-derived food (Table 3.2).

Bacterial susceptibility testing showed that in *S. enterica*, 41 isolates (28.87%) were resistant to amoxicillin, 26 (18.31%) were resistant to tetracycline, 6 (4.23%) to the combination amoxicillin/clavulanic acid, 3 (2.11%) to cephalosporins, 3 (2.11%) to aztreonam, and 3 (2.11%) to quinolones. Regarding *E. coli*, it was found 77 (78.57%) tetracycline-resistant isolates, 72 (73.47%) amoxicillin-resistant isolates, 45 (45.92%) quinolone-resistant isolates, 13 (13.27%) resistant isolates to the combination amoxicillin/clavulanic acid, 6 (6.12%) aztreonam-resistant isolates and 3 (4.08%) resistant isolates to cephalosporins.

Phenotypic screening of ESBL suggested that 18 (12.68%) *S. enterica* and 14 (14.29%) *E. coli* were ESBL producers.

It was observed that 94 bacterial isolates (39.17%) grew in EMB agar supplemented with 3.5 mg/L of colistin, of which 37 grew after 24h (30 *E. coli* and 7 *S. enterica*; 15.42%) and 57 (20 *E. coli* and 37 *S. enterica*) only after 48h (23.75%) of incubation.

Table 3.1. Origin of *Escherichia coli* and serovar of *Salmonella enterica* isolates. The numbers at the end of table are the number of strains.

Source	<i>E. coli</i> (n=98)	<i>S. enterica</i> (n=142)
Poultry		S. Typhimurium 19
		S. Enteritidis 14
		S. Anatum 11
		S. Infantis 11
		S. Havana 10
		S. 4,12:i:- 9
		S. Brandenburg 7
		S. Typhimurium -like 6
		S. Cerro 4
		S. Indiana 4
		S. Lexington 4
		S. Bredeney 3
		S. Rissen 3
		S. Virchow 3
		S. Kentucky 2
		S. Mbandaka 2
		S. Tennessee 2
		S. 9,46:-:- 1
		S. 3,15:z10: 1
		S. Salamae 4(5),12:b- 1
		S. Agona 1
		S. Bardo 1
		S. Berta 1
		S. Hadar 1
		S. Kottbus 1
		S. Llandoff 1
		S. Newport 1
	S. Ohio 1	
	S. Seftenberg 1	
	S. Schwarzengrund 1	
	Not typed 6	
	77	133
Swine		S. Derby 2
		S. Typhimurium 1
		Not typed 4
	16	7
Rabbit	3	-
Sheep	2	-
Animal feed	-	Not typed 1
Bovine	-	S. Anatum 1

Table 3.2. Frequency of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* according to biological, food and environmental samples.

	<i>E. coli</i> (n=98)	<i>S. enterica</i> (n=142)
Boots swabs		58
Carcasses/fresh meat	42	20
Ready to cook meat		18
Organs	40	2
Rectal swabs	6	
Faeces	6	24
Incubator/bed swabs	2	10
Neck skin		5
Abscess	2	
Frozen meat		2
Eggs		2
Animal feed		1

3.4.2. Screening of *mcr* and ESBL Genes

The multiplex PCR allowed for the detection of 15 *E. coli* (15.31%) carrying *mcr-1*, but not in *S. enterica* isolates. The other *mcr* genes were not detected in any isolate. All the *mcr-1* positive strains were classified as resistant to colistin, with MICs values ranging from 8 to 32 mg/L. Two of the *mcr-1* positive *E. coli* strains only grew after 48h under colistin selection, despite the MIC values of 8 and 16 mg/L. The majority of the *mcr-1* positive strains (n=9; 60%) were collected from pig samples, while the others were from poultry (n=4; 27%) and rabbits (n=2; 13%).

Phenotypic screening of ESBL revealed 13.33% (32/240 isolates) of positivity, and all were screened for *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genes. Twenty beta-lactamase-producing isolates (8.33%) were found, including 16.33% *E. coli* (16/98 *E. coli*) and 2.82% *S. enterica* (4/142 *S. enterica*). The four *S. enterica* isolates carried *bla*_{TEM-1} (2.82%). In relation to the *E. coli* isolates, 10 (10.20%) carried only *bla*_{TEM-1}. Five (5.10%) *E. coli* isolates carried, beyond *bla*_{TEM-1}, *mcr-1* (n=2), *mcr-1* and *bla*_{CTX-M-15} (n=1), *bla*_{CTX-M-1} (n=1) and *bla*_{OXY-2} (n=1). One *E. coli* carried both *mcr-1* and *bla*_{CTX-M-1}. These results are summarised in Table 3.3.

Table 3.3. Origin, phenotypic and genetic characteristics of antimicrobial resistance of *mcr-1* positive and/or ESBL-producing *E. coli* isolates.

Isolate	Source of Isolates	Date of Isolation	Growth in Agar ^a (h)	Resistance Genes	Colistin		Conjugation Frequency ^d	<i>mcr-1</i> Plasmid Typing
					MIC ^b (mg/L)	Antimicrobial Resistance ^c		
<i>E. coli</i> 162	Chicken organs	12/2017	24	<i>mcr-1</i>	8	AMC; AML; TE; CIP	10 ⁻²	P
<i>E. coli</i> 166	Fowl carcasce	01/2018	24	<i>mcr-1</i> ; <i>bla</i> _{TEM-1}	16	AMC; AML; TE; CIP	10 ⁻⁴	H12; P
<i>E. coli</i> 170	Turkey carcasce	10/2017	24	<i>mcr-1</i> ; <i>bla</i> _{TEM-1}	8	AMC; AML; TE; CIP	10 ⁻²	P
<i>E. coli</i> 176	Rabbit organs	11/2017	24	<i>mcr-1</i>	16	AML; TE; CIP	10 ⁻⁶	11/ly
<i>E. coli</i> 177	Rabbit organs	11/2017	24	<i>mcr-1</i>	32	AML; TE; CIP	10 ⁻⁷	H12
<i>E. coli</i> 182	Chicken organs	11/2017	No growth	<i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-1}	N.A.	ATM; CTX; AML; TE; CIP	n.a.	n.a.
<i>E. coli</i> 185	Swine organs	11/2017	24	<i>mcr-1</i>	16	AML; TE; CIP	10 ⁻⁷	H12
<i>E. coli</i> 186	Swine organs	11/2017	48	<i>mcr-1</i> ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-15}	16	ATM; CTX; AML; TE	10 ⁻⁵	H12
<i>E. coli</i> 189	Swine organs	11/2017	24	<i>mcr-1</i> ; <i>bla</i> _{CTX-M-1}	32	ATM; CTX; AML; TE; CIP	10 ⁻⁴	F (FIB)
<i>E. coli</i> 206	Turkey organs	11/2017	48	<i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>bla</i> _{OXY-2}	N.A.	AMC; AML; TE; CIP; CEX	n.a.	n.a.
<i>E. coli</i> 212	Swine rectal swab	12/2017	24	<i>mcr-1</i>	16	AML; TE; CIP	10 ⁻³	n.d.
<i>E. coli</i> 216	Swine rectal swab	12/2017	24	<i>mcr-1</i>	16	AMC; AML; TE; CIP	10 ⁻⁴	N
<i>E. coli</i> 219	Piglet faeces	12/2017	24	<i>mcr-1</i>	16	AML; TE	10 ⁻²	N
<i>E. coli</i> 220	Piglet faeces	12/2017	24	<i>mcr-1</i>	8	AML; TE	10 ⁻²	H11
<i>E. coli</i> 221	Swine rectal swab	12/2017	24	<i>mcr-1</i>	16	AML; TE; CIP	10 ⁻³	H11
<i>E. coli</i> 222	Swine rectal swab	12/2017	48	<i>mcr-1</i>	8	AML; TE	10 ⁻²	n.d.
<i>E. coli</i> 226	Poultry carcass	01/2018	24	<i>mcr-1</i>	16	AML; TE; CIP	10 ⁻³	n.d.

^a EMB supplemented with 3.5 mg/L colistin; ^b MICs for donors and transconjugantes.

^c Abbreviations: AMC-Amoxicillin/Clavulanic acid; AML-Amoxicillin; TE-Tetracycline; CIP-Ciprofloxacin; ATM-Aztreonam; CTX-Cefotaxime; CEX-Cefalexin; ^d Cells per Recipient; n.a.-not applicable; n.d.-not determined.

3.4.3. Conjugation Experiments

Conjugation assays were performed with the 15 *mcr-I* *E. coli* positive strains and *E. coli* J53 as the recipient cell. The *mcr-I* gene was successfully transferred to *E. coli* J53 from all the donor cells at a frequency between 10^{-7} to 10^{-2} cells per recipient (Table 3.3). Additionally, *bla*_{TEM-1} and *bla*_{CTX-M-1} were also co-transferred in *E. coli* 166, *E. coli* 170, *E. coli* 186 and *E. coli* 189, but not the *bla*_{CTX-M-15} in *E. coli* 186 (Table 3.3). The success of the gene transfer was confirmed by PCR detection of *mcr-I* and beta-lactamase genes. The transconjugants showed a resistance profile to colistin identical to the donors, with MICs values identical to the *mcr-I*-borne plasmids donor strain. PCR-based replicon typing showed that these genes were located on IncHI2, IncHII, IncP IncN and IncI₁ plasmids.

3.4.4. Growth Rates and Plasmid Stability

Growth kinetics of *E. coli* J53 and its *mcr-I*-carrying transconjugants were investigated. Significant growth rate differences between *E. coli* J53 and transconjugants 162T, 185T, 186T, 212T and 221T were found ($p < 0.05$). In addition, a significant difference in growth rates ($p = 0.0003$) was observed between transconjugants in the absence and in the presence of colistin, after 30h assessment, with a mean growth rate of 1.66 and 1.32, respectively (Figure 3.2).

The stability of the *mcr-I* plasmids was determined by serial passages for 10 days in the absence of colistin. As shown in Figures 3.3 A and B, plasmid retention rates were diverse. Briefly, in *E. coli* 177 and 185, IncHI2 plasmids were highly retained (>85%) but lost in their transconjugants (<95%). Otherwise, IncHI2 plasmids of *E. coli* 186 and its transconjugant were maintained in 37% and 31%, respectively. IncP plasmids were lost in both *E. coli* 170 and in its transconjugant; in contrast, in *E. coli* 166, 27% of parental strain and only 19% of transconjugants IncP plasmid was retained. Finally, an untypable plasmid was maintained stably in 60% of *E. coli* 189 and its transconjugants at least 10 days of passage in an antibiotic-free environment.

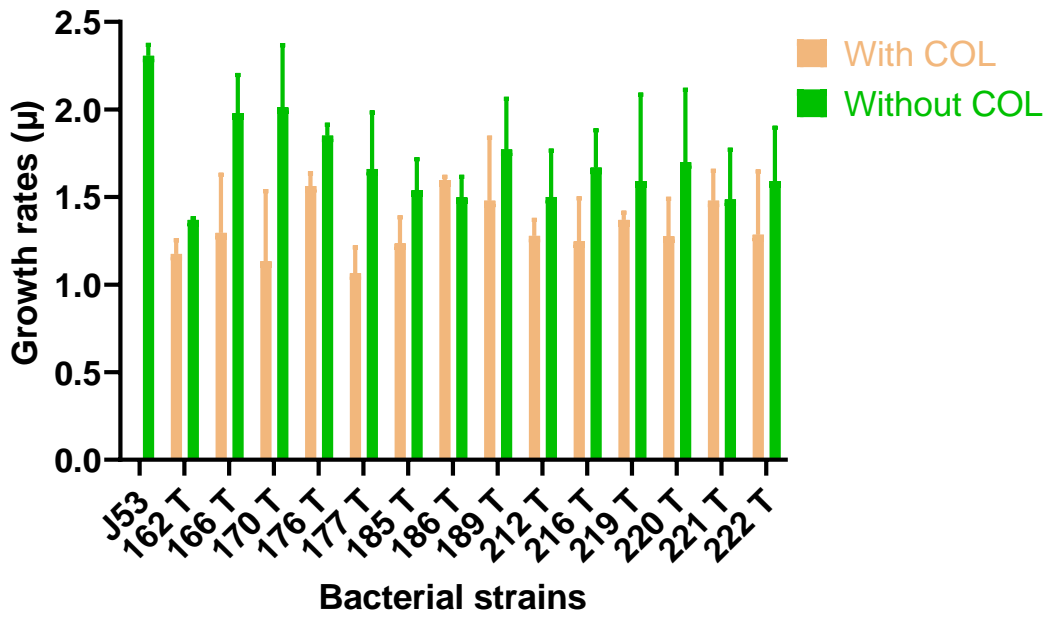
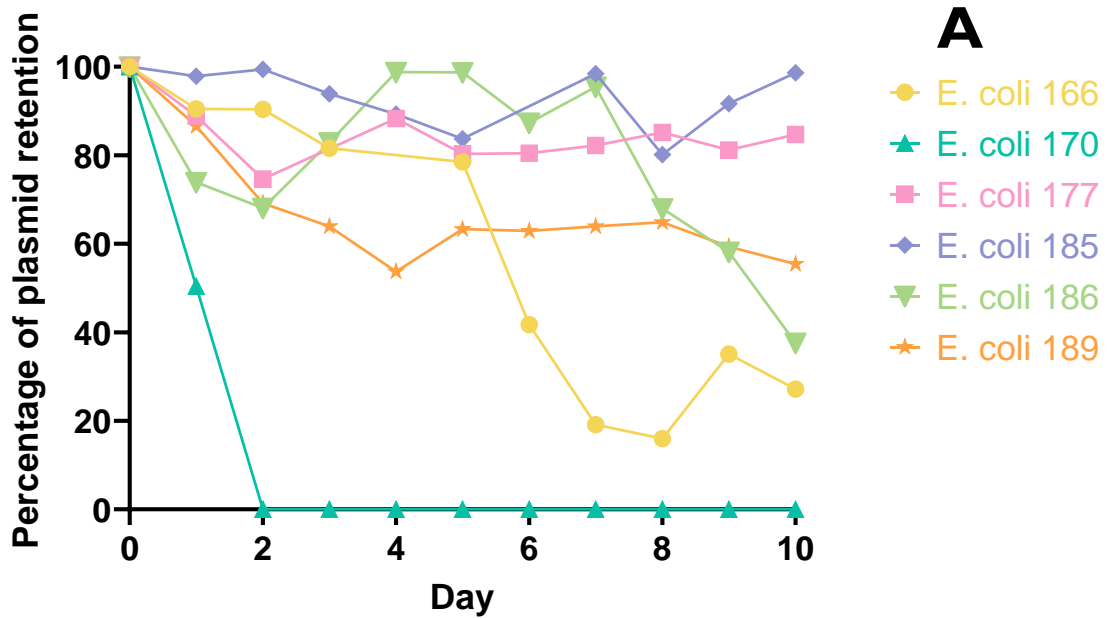


Figure 3.2. Growth kinetics assay results. Growth kinetics assays revealed that transconjugants have a mean growth rate of 1.66 in absence of COL (blue bars) and 1.32 in presence of COL (purple bars), p -value=0.0003.



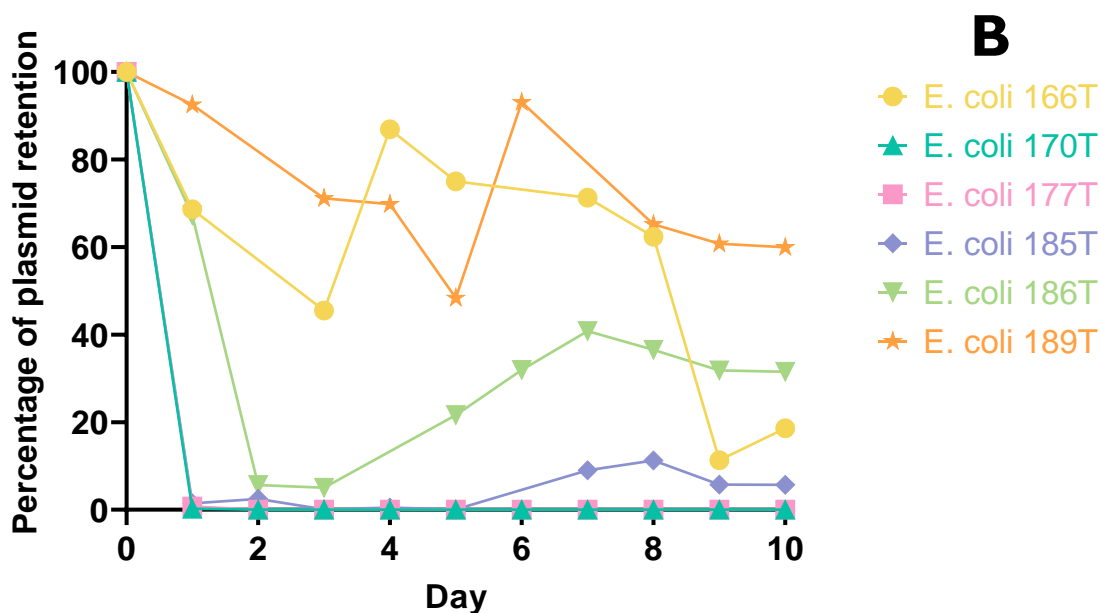


Figure 3.3. Stability of *mcr-I* plasmids. Assessment of *E. coli* donor strains (**A**) and its transconjugants (**B**) over 10 days in the absence of colistin.

3.5. Discussion

In this study, *E. coli* and *S. enterica* isolates were recovered from animal biological and food samples and from farm environments in Portugal and Spain with the objective of assessing the epidemiology of *mcr-I* to *mcr-10* genes and ESBL genes.

Only the *mcr-I* gene was identified in *E. coli* samples. The majority (60%) of *mcr-I* identified in *E. coli* was from swine samples, which is in accordance with most of the current reports, where the main sources of *E. coli* carrying *mcr-I* are pigs, poultry samples and their derivate food products^{16,31-33}. Yet, the majority of samples were from poultry, with the majority of isolates being *S. enterica*, including from boots' swabs. Surprisingly, *mcr* genes were not detected in *S. enterica* despite the growth in media supplemented with colistin. Although less frequently than in *E. coli*, there are several reports worldwide of the occurrence of *mcr* genes in *S. enterica*, mostly the *mcr-I* gene, including in Portugal^{10,33-35}. The presence of chromosomal mutations of the PmrA/PmrB and PhoP/PhoQ two-component regulatory systems, which are responsible for the biosynthesis of L-Ara4N and PEtn¹⁰, or other uncharacterised variants of *mcr* genes may explain the growth of some *S. enterica* strains under colistin selection. The mechanisms and evolutionary pathways

resulting in decreased susceptibility to colistin in certain *Salmonella* serovars remain to be fully understood, but bacterial tolerance, persistence or heteroresistance to antimicrobials and natural and spontaneous phenomena may be an explanation for bacterial growth in the presence of colistin ^{36,37}.

Intensive swine production has been pointed to as the main source of emergence and spread of mobile colistin resistance due to the wide use of colistin for treatment and control of gastrointestinal infections caused by *Enterobacterales* in pigs and piglets ^{5,38}. Also, in industrial rabbit breeding, the recorded consumption of colistin is relevant, and in fact, we found the *mcr-I* gene in two *E. coli* isolates from rabbit meat, which is rarely reported ³⁹⁻⁴¹. It is highly expected that transmission between intensive farming animals is facilitated by close contact between them ⁴². The food chain may play a major role in the spread of colistin resistance since *mcr* genes have been mostly found in samples from food-producing animals. There are several reports from human clinical samples ⁵. The rate of *mcr* genes that have been found in our study and in the rest of Europe ⁴³⁻⁴⁵ was lower compared to the high rates observed in China. This may be explained by the previously high levels of colistin consumption observed in some Asian Countries, including China, where the use of colistin as a feed additive was allowed until recently as a growth promoter ^{45,46}.

The co-occurrence of *mcr-I* with other clinically relevant resistance genes in *E. coli* was previously reported ^{4,15,16,32,47}. Here, the strains showed high levels of resistance to tetracycline and beta-lactams, as expected, because these antimicrobial agents were and are widely used in livestock production to prevent and control respiratory and gastrointestinal disease ⁴⁸, including in Portugal ⁴⁹. Although ciprofloxacin is not used in livestock production, some isolates were ciprofloxacin-resistant. This can be explained by the cross-resistance to enrofloxacin, which is commonly used in farm animals and is partially metabolised to ciprofloxacin in animals ⁵⁰. Moreover, the *mcr-I* gene can easily spread due to the use of colistin or co-selection with other antibiotic classes ⁶. Thus, the administration of different antibiotics to animals plays a key role in the development and spread of various resistance profiles ⁵¹.

Phenotypic screening of ESBL indicated a higher production of these enzymes compared to the PCR detection, which suggests that other less common ESBLs than *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTM-M-15} that were identified in this study may be produced. Additionally, there seems to

be a connection between *mcr-1* and ESBL genes, which can lead to co-selection of the resistance to beta-lactams and colistin.

All *mcr-1*-carrying *E. coli* isolates were able to transfer the colistin resistance gene by conjugation at different frequencies, as reported ⁴³. The *mcr-1* gene has been often found on IncHI2, IncHI1, IncP, IncI and IncN conjugative plasmids ^{38,52}. Other reports indicate that IncX4 and IncHI2 are the two major plasmid incompatibility groups implicated in *mcr-1* dissemination ³⁵. The genetic platforms of *mcr* in this study were variable. The plasmid IncHI2 was not completely lost in the absence of colistin, which might explain the highest frequency found. Moreover, it was shown that the dissemination of *mcr-1* is linked with the co-spread of ESBLs, namely *bla*_{CTX-M-1}. The MICs for colistin for transconjugants showed a similar value to the donor strain, suggesting that colistin resistance is specific and not influenced by other resistance mechanisms in the donor strains. Nevertheless, the colistin-resistant wild strains may display chromosomal resistance genes.

The dissemination and the high diversity of *mcr*-encoding plasmid backbones assume greater relevance in the context of livestock production, particularly in swine production ^{5,21,53,54}. Animal manure should be regarded as a source of antibiotic residues and DNA, and in this case, it is not clear that the processing through composting is effective in reducing amounts of colistin or *mcr* genes in pig manure ^{5,21,54}. The role of animal manure used in land fertilization and in the environmental dissemination of *mcr* genes should be further studied.

Many isolates, especially from *S. enterica*, grew with colistin only after 48h of incubation. As observed for two *E. coli* isolates, our study demonstrated that the prevalence of *mcr* genes might be underestimated because some positive *mcr-1* strains did not show visible growth after 24h of incubation. Since *mcr-1* may be present in colistin-susceptible strains, it has been suggested that *mcr* genes may play a physiological role in bacterial cells ⁵⁵. Thus, the prevalence of these genes may be underestimated by the breakpoint value that might need an update and/or by the time of incubation, as shown in the present study.

In addition, the slow growth of some colistin-resistant isolates might be related to a fitness cost. Studying the biological cost of exogenous DNA in the recipient cell is important to comprehend the dynamic of transmission of plasmids in a bacterial population and to further understand whether colistin withdrawal in intensive animal production may attenuate the spread of the *mcr-1* gene with positive implications in public health in the view

of the One Health context. A report showed that in China, after the ban of colistin as a growth promoter in 2017, the prevalence of colistin resistance and *mcr* genes was reduced⁵⁶. However, this is not a paradigm^{57,58}. To assess the biological cost of *mcr*-carrying-plasmid acquisition, we compared the growth rate of transconjugants and the recipient strain *E. coli* J53, observing that the carriage of the *mcr*-plasmid imposes a fitness cost to the host, as previously described⁵⁹⁻⁶¹. Also, the comparison of growth rates between transconjugants in the presence and absence of colistin showed that the presence of colistin impairs the in vitro growth of *mcr-I*-carrying bacteria resulting in reduced fitness. This suggests that colistin withdrawal from intensive animal production could indeed attenuate the spread of the *mcr-I* gene because susceptible strains would be more fit. However, plasmid stability assays revealed that the loss of plasmids was highly variable, ranging from complete loss to full retention. IncHI2 was more retained than others, which might explain their higher prevalence association with *mcr* genes, while other plasmids, such as IncP, rarely described as carrying *mcr*-genes, were partially or completely lost^{59,62}. These findings show that the acquisition of *mcr-I*-carrying plasmids reduces the fitness of the host, but plasmid loss in the absence of colistin is highly variable, and other factors beyond colistin pressure contribute to resistance-plasmid maintenance in a bacterial population. The variability in plasmid stability may be related to plasmid features (type, size) and bacterial host^{59,63}. Compensatory adaptations may explain the *mcr-I* expression at a low fitness cost. However, the mechanisms that are responsible for the equilibrium between *mcr-I* expression to provide protection in the colistin environment and normal cellular functions remain unknown and should be further studied⁵⁸.

3.6. Conclusions

We demonstrate that the prevalence of *mcr* genes might be underestimated due to the slow growth of colistin-resistant bacteria in phenotypic screening, suggesting the re-evaluation of reliable guidelines for epidemiological purposes. Colistin withdrawal from intensive farm production will not completely lead to a decrease of *mcr-I* levels since the reversal of colistin resistance mediated by *mcr* genes is not straightforward.

The results highlight the need of continuous surveillance of foodborne pathogens and implementation or improvement of antibiotic stewardship in animal production since it

promotes the emergence of bacteria carrying important clinical resistance genes, which can enter the food chain and human gut. These data are important because they can provide a basis for the development of national policies, and they can help guide the risk of colistin resistance management and assess the effect on animal, environmental and public health of possible interventions following a One Health perspective. For efficient monitoring systems at the national level, coordination between the many stakeholders is essential.

With the application of sufficient science-based risk management policies that adhere to transdisciplinary recommendations, the One Health concept is more crucial than ever to better control colistin resistance at the interface between the human, animal and environment with the goal of achieving a balance between the need to protect public health and the potential impact of risk management measures on animal health.

3.7. References

1. WHO. Global action plan on antimicrobial resistance. Accessed 10.10.2019, <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>
2. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States. Accessed 10.12.2019, <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>
3. Economou V, Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and drug resistance*. 2015;8:49-61. doi:10.2147/IDR.S55778
4. Lima T, Fernandes L, Matias M, et al. Longitudinal Study Detects the Co-Carriage of ESBL and *mcr-1* and *-4* Genes in *Escherichia coli* Strains in a Portuguese Farrow-to-Finish Swine Herd. *Animals*. 2022;12(17):2209 doi: 10.3390/ani12172209
5. Rhouma M, Beaudry F, Theriault W, Letellier A. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:1789. doi:10.3389/fmicb.2016.01789
6. EMA. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health - EMA/CVMP/CHMP/231573/2016. London: EMA; 2016.
7. Zheng B, Huang C, Xu H, et al. Occurrence and Genomic Characterization of ESBL-Producing, MCR-1-Harboring *Escherichia coli* in Farming Soil. *Front Microbiol*. 2017;8:2510. doi:10.3389/fmicb.2017.02510
8. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum beta-lactamases in Gram Negative Bacteria. *Journal of global infectious diseases*. 2010;2(3):263-74. doi:10.4103/0974-777X.68531
9. WHO. Critically important antimicrobials for human medicine – 3rd rev. Accessed 10.10.2019, <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/77376/?jsessionid=0C947CA333F9F82CF7708F537AE6FB85?sequence=1>
10. Lima T, Domingues S, Da Silva GJ. Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. *Microorganisms*. 2019;7(2) doi:10.3390/microorganisms7020055
11. Zafer MM, El-Mahallawy HA, Abdulhak A, Amin MA, Al-Agamy MH, Radwan HH. Emergence of colistin resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from cancer patients. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2019;18(1):40. doi:10.1186/s12941-019-0339-4
12. Pragasam AK, Shankar C, Veeraraghavan B, et al. Molecular Mechanisms of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Causing Bacteremia from India-A First Report. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:2135. doi:10.3389/fmicb.2016.02135
13. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(2):161-8. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7
14. Hadjadj L, Baron SA, Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Co-occurrence of Variants of *mcr-3* and *mcr-8* Genes in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate From Laos. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:2720. doi:10.3389/fmicb.2019.02720

15. Fournier C, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Poirel L. Occurrence of CTX-M-15- and MCR-1-producing Enterobacterales in pigs in Portugal: Evidence of direct links with antibiotic selective pressure. *International journal of antimicrobial agents*. 2019. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.09.006
16. Manageiro V, Clemente L, Romao R, et al. IncX4 plasmid carrying the new *mcr-1.9* gene variant in a CTX-M-8-producing *Escherichia coli* isolate recovered from swine. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:367. doi:10.3389/fmicb.2019.00367
17. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):508-516. doi:10.1080/22221751.2020.1732231
18. Andersson DI. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr Opin Microbiol*. 2006;9(5):461-5. doi:10.1016/j.mib.2006.07.002
19. Humphrey B, Thomson NR, Thomas CM, et al. Fitness of *Escherichia coli* strains carrying expressed and partially silent IncN and IncPI plasmids. *BMC microbiology*. 2012;12:53. doi:10.1186/1471-2180-12-53
20. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(4):260-71. doi:10.1038/nrmicro2319
21. Lima T, Domingues S, Da Silva GJ. Manure as a Potential Hotspot for Antibiotic Resistance Dissemination by Horizontal Gene Transfer Events. *Veterinary sciences*. 2020;7(3). doi:10.3390/vetsci7030110
22. Liu Y, Liu JH. Monitoring colistin resistance in food animals, an urgent threat. *Expert review of anti-infective therapy*. 2018;16(6):443-446. doi:10.1080/14787210.2018.1481749
23. Grimont PA, Weill F-X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*. 2007;9:1-166.
24. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0. 2019.
25. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. A Universal Culture Medium for Screening Polymyxin-Resistant Gram-Negative Isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2016;54(5):1395-9. doi:10.1128/JCM.00446-16
26. Mendonca N, Leitao J, Manageiro V, Ferreira E, Canica M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(6):1946-55. doi:10.1128/AAC.01412-06
27. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2018;23(6). doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672
28. Borowiak M, Baumann B, Fischer J, et al. Development of a Novel *mcr-6* to *mcr-9* Multiplex PCR and Assessment of *mcr-1* to *mcr-9* Occurrence in Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Isolates From Environment, Feed, Animals and Food (2011-2018) in Germany. *Frontiers in microbiology*. 2020;11:80. doi:10.3389/fmicb.2020.00080

29. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*. 2005;63(3):219-28. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018
30. Bryksin AV, Matsumura I. Rational design of a plasmid origin that replicates efficiently in both gram-positive and gram-negative bacteria. *PLoS one*. 2010;5(10):e13244. doi:10.1371/journal.pone.0013244
31. Wang Y, Hu Y, Cao J, et al. Antibiotic resistance gene reservoir in live poultry markets. *The Journal of infection*. 2019;78(6):445-453. doi:10.1016/j.jinf.2019.03.012
32. Clemente L, Manageiro V, Correia I, et al. Revealing *mcr-1*-positive ESBL-producing *Escherichia coli* strains among *Enterobacteriaceae* from food-producing animals (bovine, swine and poultry) and meat (bovine and swine), Portugal, 2010-2015. *International journal of food microbiology*. 2019;296:37-42. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.006
33. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2020;75(11):3087-3095. doi:10.1093/jac/dkaa205
34. Figueiredo R, Card RM, Nunez J, et al. Detection of an *mcr-1*-encoding plasmid mediating colistin resistance in *Salmonella enterica* from retail meat in Portugal. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016;71(8):2338-40. doi:10.1093/jac/dkw240
35. Campos J, Cristino L, Peixe L, Antunes P. MCR-I in multidrug-resistant and copper-tolerant clinically relevant *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- and *S. Rissen* clones in Portugal, 2011 to 2015. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2016;21(26). doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30270
36. Band VI, Weiss DS. Heteroresistance: A cause of unexplained antibiotic treatment failure? *PLoS pathogens*. 2019;15(6):e1007726. doi:10.1371/journal.ppat.1007726
37. Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature reviews Microbiology*. 2016;14(5):320-30. doi:10.1038/nrmicro.2016.34
38. Kieffer N, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Poirel L. High Rate of MCR-I-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among Pigs, Portugal. *Emerging infectious diseases*. 2017;23(12):2023-2029. doi:10.3201/eid2312.170883
39. Freitas-Silva J, Inacio AS, Mourao J, et al. Occurrence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from rabbits of intensive farming. *Veterinary microbiology*. 2018;227:78-81. doi:10.1016/j.vetmic.2018.10.020
40. Agnoletti F, Brunetta R, Bano L, Drigo I, Mazzolini E. Longitudinal study on antimicrobial consumption and resistance in rabbit farming. *International journal of antimicrobial agents*. 2018;51(2):197-205. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.10.007
41. Wang X, Zhai Z, Zhao X, et al. Occurrence and characteristics of *Escherichia coli mcr-1*-like in rabbits in Shandong, China. *Veterinary medicine and science*. 2021;7(1):219-225. doi:10.1002/vms3.340
42. Argudin MA, Deplano A, Meghraoui A, et al. Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. *Antibiotics*. 2017;6(2). doi:10.3390/antibiotics6020012

43. Wang R, van Dorp L, Shaw LP, et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nature communications*. 2018;9(1):1179. doi:10.1038/s41467-018-03205-z
44. Tong H, Liu J, Yao X, et al. High carriage rate of *mcr-1* and antimicrobial resistance profiles of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolates in swine faecal samples collected from eighteen provinces in China. *Veterinary microbiology*. 2018;225:53-57. doi:10.1016/j.vetmic.2018.09.018
45. Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, et al. 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. *International journal of antimicrobial agents*. 2015;46(3):297-306. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005
46. Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends in microbiology*. 2018;26(9):794-808. doi:10.1016/j.tim.2018.02.006
47. Li B, Ke B, Zhao X, et al. Antimicrobial Resistance Profile of *mcr-1* Positive Clinical Isolates of *Escherichia coli* in China From 2013 to 2016. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:2514. doi:10.3389/fmicb.2018.02514
48. Burow E, Rostalski A, Harlizius J, et al. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment. *Preventive veterinary medicine*. 2019;165:52-62. doi:10.1016/j.prevetmed.2019.02.008
49. Figueiredo R, Henriques A, Sereno R, Mendonca N, da Silva GJ. Antimicrobial resistance and extended-spectrum beta-lactamases of *Salmonella enterica* serotypes isolated from livestock and processed food in Portugal: an update. *Foodborne pathogens and disease*. 2015;12(2):110-7. doi:10.1089/fpd.2014.1836
50. Schulz J, Kemper N, Hartung J, Janusch F, Mohring SAI, Hamscher G. Analysis of fluoroquinolones in dusts from intensive livestock farming and the co-occurrence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. *Scientific reports*. 2019;9(1):5117. doi:10.1038/s41598-019-41528-z
51. Huang X, Yu L, Chen X, et al. High Prevalence of Colistin Resistance and *mcr-1* Gene in *Escherichia coli* Isolated from Food Animals in China. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:562. doi:10.3389/fmicb.2017.00562
52. Li XP, Sun RY, Song JQ, et al. Within-host heterogeneity and flexibility of *mcr-1* transmission in chicken gut. *International journal of antimicrobial agents*. 2020;55(1):105806. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.09.010
53. Brauer A, Telling K, Laht M, et al. Plasmid with Colistin Resistance Gene *mcr-1* in Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Pig Slurry in Estonia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(11):6933-6936. doi:10.1128/AAC.00443-16
54. Gao Y, Lu C, Shen D, et al. Elimination of the risks of colistin resistance gene (*mcr-1*) in livestock manure during composting. *Environ Int*. 2019;126:61-68. doi:10.1016/j.envint.2019.02.015
55. Carroll LM, Gaballa A, Guldemann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant,

Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *mBio*. 2019;10(3). doi:10.1128/mBio.00853-19

56. Wang Y, Xu C, Zhang R, et al. Changes in colistin resistance and *mcr-I* abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. *The Lancet Infectious diseases*. 2020;20(10):1161-1171. doi:10.1016/S1473-3099(20)30149-3

57. Kyung-Hyo D, Jae-Won B, Wan-Kyu L. Antimicrobial Resistance Profiles of *Escherichia coli* from Diarrheic Weaned Piglets after the Ban on Antibiotic Growth Promoters in Feed. *Antibiotics*. 2020;9(11). doi:10.3390/antibiotics9110755

58. Yang Q, Li M, Spiller OB, et al. Balancing *mcr-I* expression and bacterial survival is a delicate equilibrium between essential cellular defence mechanisms. *Nature communications*. 2017;8(1):2054. doi:10.1038/s41467-017-02149-0

59. Ma K, Feng Y, Zong Z. Fitness cost of a *mcr-I*-carrying IncHI2 plasmid. *PLoS one*. 2018;13(12):e0209706. doi:10.1371/journal.pone.0209706

60. Wu J, Dong X, Zhang L, Lin Y, Yang K. Reversing Antibiotic Resistance Caused by Mobile Resistance Genes of High Fitness Cost. *mSphere*. 2021;6(3):e0035621. doi:10.1128/mSphere.00356-21

61. Li W, Liu Z, Yin W, et al. MCR Expression Conferring Varied Fitness Costs on Host Bacteria and Affecting Bacteria Virulence. *Antibiotics*. 2021;10(7). doi:10.3390/antibiotics10070872

62. Shen C, Zhong LL, Yang Y, et al. Dynamics of *mcr-I* prevalence and *mcr-I*-positive *Escherichia coli* after the cessation of colistin use as a feed additive for animals in China: a prospective cross-sectional and whole genome sequencing-based molecular epidemiological study. *The Lancet Microbe*. 2020;1(1):e34-e43. doi:10.1016/S2666-5247(20)30005-7

63. Wu R, Yi LX, Yu LF, et al. Fitness Advantage of *mcr-I*-Bearing IncI2 and IncX4 Plasmids in Vitro. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:331. doi:10.3389/fmicb.2018.0033

CAPÍTULO IV

Identification of *bla*_{OXY-2-12} Producing *Escherichia coli* from Poultry: is OXY-type β -lactamase Prevalence Underestimated?

Em submissão:

- Tiago Lima, Aida Duarte, João Perdigão, Constança Pomba, Sara Domingues, Gabriela Jorge da Silva. Identification of *bla*_{OXY-2-12} producing *Escherichia coli* from poultry: is OXY-type β -lactamase prevalence underestimated?

4.1. Abstract

The β -lactamase *bla*_{OXY} gene is uncommon in the *Enterobacteriaceae* family, except in human clinical *Klebsiella* species. In this study a *bla*_{OXY-2-12} and *bla*_{TEM-1} producer *Escherichia coli* 206FFUC was isolated from turkey organs recovered from a Spanish aviary. Antibiotic susceptibility testing was performed by disc diffusion method and *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes were detected by PCR followed by sequencing of amplicons. The *bla*_{OXY-2} gene was amplified using amplification primers for *bla*_{CTX-M}. A new pair of primers was designed to amplify the entire *bla*_{OXY-2} gene. The Inc FIB and FIC(FII) plasmids were transferred by conjugation to *E. coli* J53 at frequencies of 10^{-8} . Whole Genome Sequencing confirmed the species and identified the strain as *E. coli* O153:H37, included in the sequence type ST162. Our results highlight that *bla*_{OXY} genes are able to disseminate horizontally regardless of bacterial species and, on the other hand, the real prevalence of *bla*_{OXY} and *bla*_{CTX-M} genes may be under- and overestimated, respectively.

Keywords: OXY-2; CTX-M; *Escherichia coli*; plasmids; conjugation; poultry production.

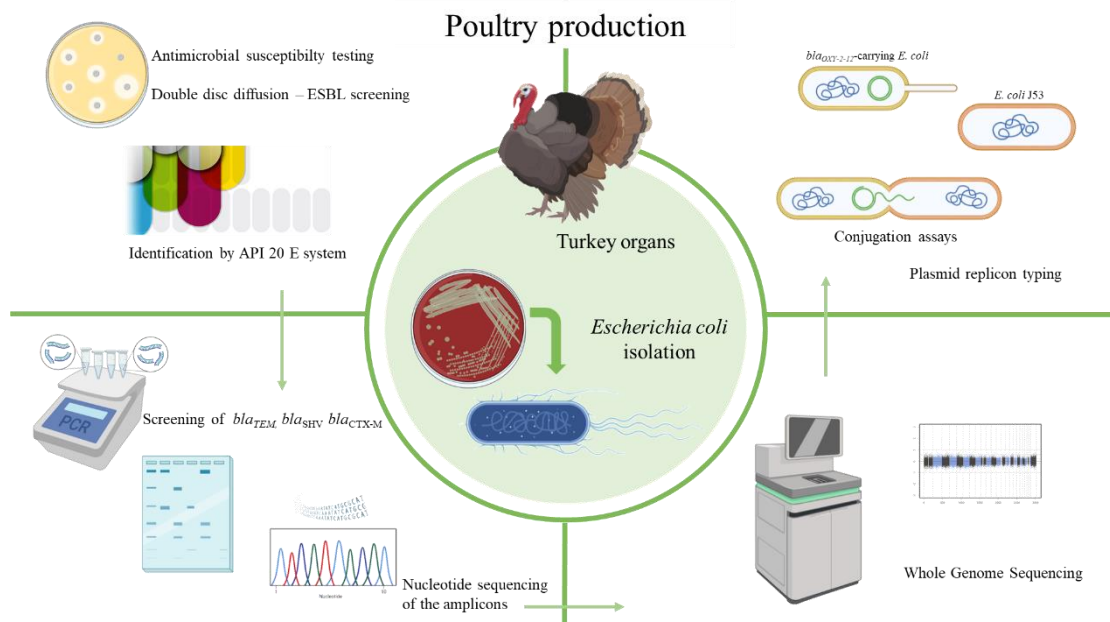


Figure 4.1. Chapter graphical abstract.

4.2. Brief Report

In November 2017, as part of an antimicrobial resistance epidemiological study, *Escherichia coli* 206FFUC was isolated from turkey organs recovered from a Spanish aviary. Identification was performed by API 20E system (BioMérieux). Antimicrobial susceptibility testing was performed by the disc diffusion method and results were interpreted according to EUCAST breakpoints. PCR was used for detection of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} type genes with the primers in use in our laboratory, as previously described ¹, followed by Sanger sequencing of amplicons (Figure 4.2). Conjugation assays were performed using sodium azide-resistant *E. coli* J53 as a recipient strain. Transconjugants were selected on Mueller Hinton agar supplemented with 150 mg/l of sodium azide and 20 mg/L of ampicillin ². Whole genome sequencing (WGS) was performed at STABVida Portugal. Sequencing libraries were prepared using the KAPA HyperPrep Library Preparation Kit (Roche, Switzerland) and sequenced using an Illumina HiSeq Novaseq 6000 platform with paired-end reads (2 × 151 bp). *De novo* assembly was carried out using SPAdes and *in silico* species identification was performed using the PubMLSt species identification tool implementing ribosomal Multilocus Sequence Typing (rMLST). The multi-locus sequence typing (MLST) data, mobile genetic elements and their relation to antimicrobial resistance genes and virulence factors were characterized *in silico* by MLST, SerotypeFinder and Mobile Element Finder (MGE) tools in CGE (<https://cge.cbs.dtu.dk/>) ³.

The WGS confirmed the species and identified the strain as *E. coli* O153:H37, included in the sequence type ST162. The antimicrobial susceptibility test showed resistance to amoxicillin/clavulanic acid, cefalexin, quinolones, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole, erythromycin and susceptibility to ceftazidime, cefotaxime, ceftiofur, aztreonam and imipenem. PCR amplification and sequencing confirmed the *bla*_{TEM-1} gene but the 543 bp amplicon, which was expected to correspond to the *bla*_{CTX-M}, was identified as the *bla*_{OXY-2} gene. To obtain a full allelic identification, a pair of primers was designed to amplify the entire *bla*_{OXY-2} gene: Fw [5'-ATGATAAAAAGTTCGTGGCG-3'] and Rv [5'-TTAAAGCCCTTCGGTCACGA-3']. Sanger sequencing revealed 100% genetic homology with *bla*_{OXY-2-12} identified in *Klebsiella oxytoca* strain FDAARGOS_1333 (GenBank accession number: CP070020.1) (Figure 4.2).

OXY-2_Fw	ATGATAAAAAGTTCGTGGCC	-----	20
OXY-2_Rw	-----	-----	0
CTX_F	-----	-----	0
CTX_R	-----	-----	0
<i>bla_{OXY-2-12}</i> gene	ATGATAAAAAGTTCGTGGCCGTAATAATTGCAATGCTAGCCGCCGCGTTCCGCTGCTGCTG	-----	60
OXY-2_Fw	-----	-----	20
OXY-2_Rw	-----	-----	0
CTX_F	-----	-----	0
CTX_R	-----	-----	0
<i>bla_{OXY-2-12}</i> gene	GCGAGCGGCGCACTGTGGGCCAGTACCGATGCTATCCATCAGAAGCTGACAGATCTCGAG	-----	120
OXY-2_Fw	-----	-----	20
OXY-2_Rw	-----	-----	0
CTX_F	-----	-----	0
CTX_R	-----	-----	0
<i>bla_{OXY-2-12}</i> gene	AAGCGTTCAGCGGCGAGGTTGGGCGTGGCGCTAATCAACACGGCAGATAATTCTCAAATC	-----	180
OXY-2_Fw	-----	-----	20
OXY-2_Rw	-----	-----	0
CTX_F	-----	TTTGGCATGTGCAGTACCAGTAA	23
CTX_R	-----	-----	0
<i>bla_{OXY-2-12}</i> gene	TTATATCGGCGCAGCAGCGTTTGGCCATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCC	-----	240
OXY-2_Fw	-----	-----	20
OXY-2_Rw	-----	-----	0
CTX_F	-----	-----	23
CTX_R	-----	-----	0
<i>bla_{OXY-2-12}</i> gene	GCGGTATTAAACAGAGCGAAAGCAATAAAGAGGTGGTAAATAAAGGCTGGAGATTAAC	-----	300
OXY-2_Fw	-----	-----	20
OXY-2_Rw	-----	-----	0
CTX_F	-----	-----	23
CTX_R	-----	-----	0
<i>bla_{OXY-2-12}</i> gene	GCAGCCGATTTGGTGGTCTGGAGTCCGATTACCGAAAACATCTCCAGAGCGGAATGACG	-----	360
OXY-2_Fw	-----	-----	20
OXY-2_Rw	-----	-----	0
CTX_F	-----	-----	23
CTX_R	-----	-----	0
<i>bla_{OXY-2-12}</i> gene	CTGGCTGAGCTAAGCGGCGCAGCTGCAATATAGCGACAATACGGCGATGAATCTGATC	-----	420
OXY-2_Fw	-----	-----	20
OXY-2_Rw	-----	-----	0
CTX_F	-----	-----	23
CTX_R	-----	-----	0
<i>bla_{OXY-2-12}</i> gene	ATCGGCTACCTTGGCGGGCCGAAAAGTCACCGCCTTCGCCCGCAGTATCGGCGATGCC	-----	480
OXY-2_Fw	-----	-----	20
OXY-2_Rw	-----	-----	0
CTX_F	-----	-----	23
CTX_R	-----	-----	0
<i>bla_{OXY-2-12}</i> gene	ACCTTTCGTCTCGATCGTACGGAGCCCACGCTGAATACCGCCATCCCGGCGATGAGCGT	-----	540
OXY-2_Fw	-----	-----	20
OXY-2_Rw	-----	-----	0
CTX_F	-----	-----	23
CTX_R	-----	-----	0
<i>bla_{OXY-2-12}</i> gene	GATACCAGCACGCCGCTGGCGATGGCTGAAAGCCTGCGCAAGCTGACGCTTGGCGATGCG	-----	600
OXY-2_Fw	-----	-----	20
OXY-2_Rw	-----	-----	0
CTX_F	-----	-----	23
CTX_R	-----	-----	0
<i>bla_{OXY-2-12}</i> gene	CTGGCGAACAGCAACGCGCCAGTTAGTCACCTGGCTGAAAGGCAATACCACGGCGGG	-----	660

OXY-2_Fw	-----	20
OXY-2_Rw	-----	0
CTX_F	-----	23
CTX_R	-----	0
<i>bla</i> _{OXY-2-12} gene	CAAAGCATTTCGCGCGGGCCTGCCTGAAAGCTGGGTGGTCGGCGATAAAACCGGTGCCGGA	720
OXY-2_Fw	-----	20
OXY-2_Rw	-----	0
CTX_F	-----	23
CTX_R	-----	22
<i>bla</i> _{OXY-2-12} gene	GATTACGGCACCACCAATGATATTCGCGTTATCTGGCCGAAAATCACGCTCCGCTGGTA	780
OXY-2_Fw	-----	20
OXY-2_Rw	-----	0
CTX_F	-----	23
CTX_R	-----	22
<i>bla</i> _{OXY-2-12} gene	TTAGTCACCTACTTTACCCAGCCGACGAGGATGCGAAAAACCGCAAAGAGGTGTAGCC	840
OXY-2_Fw	-----	20
OXY-2_Rw	-----TCGTGACCGAAGGGCTTTAA	20
CTX_F	-----	23
CTX_R	-----	22
<i>bla</i> _{OXY-2-12} gene	GCAGCGGCAAAAATCGTGACCGAAGGGCTTTAG	873

Figure 4.2. The *bla*_{OXY-2-12} gene and primers used in this study. Alignment of primers for *bla*_{CTX-M} gene amplification (represented in green) with the *bla*_{OXY-2-12} gene entire sequence. Homology between primers and *bla*_{OXY-2-12} gene sequence was represented in blue. The fragment the fragment resulting from this amplification has a size of 543 bp. Primers for amplification of entire *bla*_{OXY-2-12} gene, was represented in orange, originating an amplicon with a size of 873 bp.

Conjugation was successful, occurring at frequencies of 2.1×10^{-8} to 6.25×10^{-8} cells per recipient. Transconjugants showed identical β -lactam susceptibility phenotype as the donor strain *E. coli* 206FFUC. After confirmation by PCR and sequencing it was identified the genes *bla*_{OXY-2-12}, *bla*_{TEM-1} and two replicon types FIB and FIC(FII).

WGS analysis for resistance genes across the assembled genome (AMRFinder software) corroborated the phenotypic susceptibility pattern [*bla*_{TEM-1}, *bla*_{EC-18}, *aadA1*, *aadA2*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *dfrA14*, *dfrA12*, *sul2*, *sul3*, *tet(A)*, *tet(M)*, *amlA1*, *mef(B)*] (Table 4.1) but failed to detect *bla*_{OXY-2-12} gene. This may be because the assembly of short-reading sequencing data practically always results in a fragmented genome assembly, increasing the difficulty of plasmid identification from assemblies^{4,5}. Moreover, there is no tool able to predict distinct plasmid sequences fully and unambiguously. Larger plasmids prediction remains challenging using only short-read sequencing data⁴.

Table 4.1. Antimicrobial resistance genes type in *E. coli* 206FFUC by WGS

Resistance gene	Resistance phenotype
<i>aadA1</i>	
<i>aadA2</i>	
<i>aph(3'')-Ib</i>	Streptomycin
<i>aph(6)-Id</i>	
<i>bla_{EC-18}</i>	Cefoxitin
<i>bla_{TEM-1}</i>	Penicillins
<i>cmIA1</i>	Chloramphenicol
<i>dfrA14</i>	
<i>dfrA12</i>	Trimethoprim
<i>sul2</i>	
<i>sul3</i>	Sulfonamide
<i>mef(B)</i>	Macrolide
<i>tet(A)</i>	
<i>tet(M)</i>	Tetracycline

The *bla_{OXY}* gene is intrinsic to the *Klebsiella oxytoca* complex and encodes a chromosomal class A beta-lactamase produced at low level that confers resistance to aminopenicillins and carboxypenicillins. The genetic diversity of the *bla_{OXY}* genes allowed to define eight groups, *bla_{OXY-1}* to *bla_{OXY-8}*⁶. Typically, *K. oxytoca* (*sensu stricto*) included to phylogroup Ko2 carries the *bla_{OXY-2}* gene and variants. The plasmid location of *bla_{OXY}* was reported for the first time in *K. oxytoca* and *K. pneumoniae*⁷. However, they have been rarely reported in other bacteria, and so far, only identified in uropathogenic *E. coli*⁸ and in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from food and human patients⁹.

Our results highlight that *bla_{OXY}* genes are able to disseminate not only in the clinical environment but also in intensive animal production regardless of bacterial species. The antimicrobial susceptibility profile of OXY beta-lactamases might be masked by the extended-spectrum beta-lactamases activity often produced by clinical strains. Similar activity profiles against β -lactams are shared by the different *bla_{OXY}* groups, though mutations in the promoter region of the gene lead to overproduction of OXY and an increase in the hydrolytic activity against β -lactamase inhibitor combination agents,

monobactams and some broad-spectrum cephalosporins (cefotaxime and ceftriaxone), but typically not to ceftazidime^{7,10}. This diversity of susceptibility profiles poses a challenge to the phenotypic differentiation of β -lactamase classes, highlighting the need for genotypic testing. Numerous PCR-based typing assays for the identification of *bla*_{CTX-M} genes have been developed, including PCR amplification with universal degenerated primers targeting the CTX-M and OXY/KI-enzyme genes^{11,12}. However, our *bla*_{CTX-M -type} primers amplified a region that had 100% homology with the *bla*_{OXY-2} sequence. Different primers also amplified this sequence^{8,9}. This finding suggests, on one hand, that confirmation with sequencing is required in order to avoid erroneous results and, on the other hand, that the real prevalence of *bla*_{OXY} genes may be underestimated and, in opposition, *bla*_{CTX-M} genes may be overestimated. By aligning the primers used to amplify the *bla*_{CTX-M} gene against the entire *bla*_{OXY} gene as a template, it is possible to verify that the resulting amplicon has exactly the same size, 543 bp, as would be expected in the case of amplifying a *bla*_{CTX-M} gene (Figure 4.2).

In conclusion, *bla*_{OXY} genes can be located in conjugative plasmids that can be spread horizontally across different bacterial species. The real prevalence of *bla*_{OXY} and *bla*_{CTX-M} genes may be under- and overestimated, respectively. Epidemiologic surveillance is paramount to early detection of OXY-type β -lactamase, though this could be hampered at the laboratorial level if sequencing techniques are not employed.

4.3. References

1. Vubil D, Figueiredo R, Reis T, Canha C, Boaventura L, GJ DAS. Outbreak of KPC-3-producing ST15 and ST348 *Klebsiella pneumoniae* in a Portuguese hospital. *Epidemiol Infect.* 2017;145(3):59-599. doi:10.1017/S0950268816002442
2. Lima T, Loureiro D, Henriques A, et al. Occurrence and Biological Cost of *mcr-1*-Carrying Plasmids Co-harboring Beta-Lactamase Resistance Genes in Zoonotic Pathogens from Intensive Animal Production. *Antibiotics.* 2022;11(10):1356. doi: 10.3390/antibiotics11101356
3. Johansson MHK, Bortolaia V, Tansirichaiya S, Aarestrup FM, Roberts AP, Petersen TN. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2021;76(1):101-109. doi:10.1093/jac/dkaa390
4. Arredondo-Alonso S, Willems RJ, van Schaik W, Schurch AC. On the (im)possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. *Microbial genomics.* 2017;3(10):e000128. doi:10.1099/mgen.0.000128
5. de Toro M, Lanza VF, Vielva L, Redondo-Salvo S, de la Cruz F. Plasmid Reconstruction from Next-Gen Data: A Detailed Protocol for the Use of PLACNETw for the Reconstruction of Plasmids from WGS Datasets. *Methods in molecular biology.* 2020;2075:323-339. doi:10.1007/978-1-4939-9877-7_23
6. Yang J, Long H, Hu Y, Feng Y, McNally A, Zong Z. *Klebsiella oxytoca* Complex: Update on Taxonomy, Antimicrobial Resistance, and Virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2022;35(1):e0000621. doi:10.1128/CMR.00006-21
7. Gonzalez-Lopez JJ, Coelho A, Larrosa MN, Lavilla S, Bartolome R, Prats G. First detection of plasmid-encoded *bla_{OXY}* beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2009;53(7):3143-6. doi:10.1128/AAC.01473-08
8. Decano AG, Tran N, Al-Foori H, et al. Plasmids shape the diverse accessory resistomes of *Escherichia coli* ST131. *Access microbiology.* 2021;3(1):acmi000179. doi:10.1099/acmi.0.000179
9. Ma Y, Li M, Xu X, et al. High-levels of resistance to quinolone and cephalosporin antibiotics in MDR-ACSSuT *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* mainly isolated from patients and foods in Shanghai, China. *International journal of food microbiology.* 2018;286:190-196. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.022
10. Tsakris A, Poulou A, Markou F, et al. Dissemination of clinical isolates of *Klebsiella oxytoca* harboring CMY-31, VIM-1, and a New OXY-2-type variant in the community. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2011;55(7):3164-8. doi:10.1128/AAC.00102-11
11. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* and *bla_{CTX-M}* genes in *Enterobacteriaceae*. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica.* 2007;115(12):1400-8. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.00722.x
12. Monstein HJ, Tarnberg M, Nilsson LE. Molecular identification of CTX-M and *bla_{OXY/KI}* beta-lactamase genes in *Enterobacteriaceae* by sequencing of universal M13-sequence tagged PCR-amplicons. *BMC infectious diseases.* 2009;9:7. doi:10.1186/1471-2334-9-7

CAPÍTULO V

Interspecies Transfer of Colistin Resistance *mcr-1* Gene by Natural Transformation and Virulence Features of *mcr-1* Harbouring Strains

Em preparação para submissão:

- Tiago Lima, Ana Abrantes, Hugo Tavares, Constança Pomba, Sara Domingues, Gabriela Jorge da Silva. Interspecies Transfer of Colistin Resistance *mcr-1* Gene by Natural Transformation and Virulence Features of *mcr-1* Harbouring Strains

5.1. Abstract

Antibiotic resistance genes pose a severe threat to human and animal health on a global scale due to their emergence and spread by horizontal gene transfer events in the environment and in clinical settings. Although conjugation is considered to be the most common mechanism responsible for new resistance acquisition, and has been pointed as the main mechanism for *mcr* genes dissemination, no study had shown the ability of the *mcr-I* gene to be transferred by natural transformation. Acquisition of *mcr*-gene by HGT can affect the virulence traits of the strain, such as biofilm formation ability. The main aim of this study was to assess the role of natural transformation in the dissemination of *mcr-I* gene between genetically unrelated bacterial species and also to assess biofilm formation ability in bacteria carrying the *mcr-I* gene. Six *Escherichia coli* and two *Salmonella* Typhimurium isolates carrying *mcr-I* gene were used as the DNA donor bacteria in natural transformation assays performed by filter transformation using the naturally competent *A. baylyi* BD413 as a recipient cell. The *mcr-I* gene was successfully transferred to *A. baylyi* BD413 at a frequency of $6,8 \times 10^{-8}$ to $1,2 \times 10^{-7}$ cells per recipient; *bla*_{CTX-M-1} and class I integron were also co-transferred from one *E. coli* and one *Salmonella* isolates, respectively. The ability for biofilm formation was compared between *E. coli* J53 and its transconjugants carrying *mcr-I* gene by using crystal violet assay. In conclusion, *mcr* genes can be disseminated by natural transformation, explaining the acquisition of *mcr* genes by *Acinetobacter* spp. without conjugative plasmids. Moreover, acquisition of the *mcr*-bearing plasmid by bacteria increases the amount of biofilm, a virulence trait.

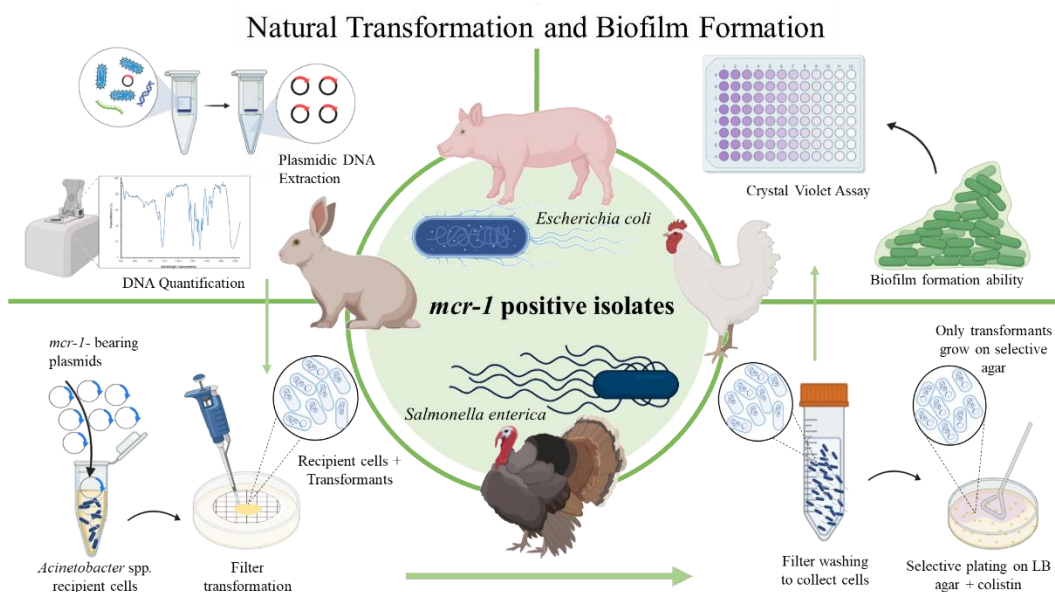


Figure 5.1. Chapter graphical abstract.

5.2. Introduction

Antimicrobial resistance is considered a growing threat to human, animal and environmental health in the 21st century, negatively affecting the socioeconomic growth of countries ¹. Antimicrobial resistance is a global concern and resulted from extensive use and misuse of antimicrobial agents in human and veterinary medicine and agricultural settings ². In veterinary and agricultural niches, the increasing need of animal protein for human consumption accelerates the development of modern and intensive animal production, which includes antimicrobial use with different purposes ³.

Colistin and third-generation cephalosporins are classified as "Highest Priority Critically Important Antimicrobials" for human medicine, according to the World Health Organization ⁴ and its use in animals should be managed to mitigate the risk to public health⁵. However, these antibiotics continue to be used in intensive farming production ⁶. Colistin and third-generation cephalosporins resistance has been gradually reported in the last few years, particularly among *Enterobacterales*, essentially due to ubiquitously spread of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) and mobilised colistin resistance (*mcr*) genes by horizontal gene transfer (HGT) events ⁷⁻⁹.

In contrast to transduction and natural transformation, which do not involve direct contact between the donor and recipient cells, conjugation, which takes place when a donor bacterium transfers genes directly to a recipient cell, is reported to be the most common mechanism of HGT between different bacteria species and it has been pointed as the main mechanism of *mcr* genes dissemination worldwide ^{3,7}.

Natural transformation occurs in diverse environments, such as soil, water ^{10,11}, and food ¹², by diverse bacterial species, such as *Acinetobacter baylyi*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas stutzeri*, or some that are part of the animal digestive tract, like *Campylobacter* spp. ³. There are some human pathogen species naturally competent, however only a few studies also showed that *Acinetobacter* spp. human pathogens can show natural competence ¹³⁻¹⁵. *Acinetobacter* species can express competence, a physiological state that allows them to take up foreigner genetic material from their surroundings, which contributes to the acquisition of antimicrobial resistance genes and mobile genetic elements from unrelated species ^{14,16}. While ESBL genes have been reported frequently among *Acinetobacter* species, the occurrence of *mcr* is less frequent ^{17,18}. MCR-I and MCR-4 families

are the most frequently found in *Acinetobacter* spp. but *mcr-2* and *mcr-3* genes have been described too¹⁹. However, the acquisition of conjugative plasmids does not entirely explain resistance in *Acinetobacter* spp.²⁰. Many of the plasmids-borne *mcr*-genes in *Acinetobacter* spp. were unable to conjugate¹⁹. Even while natural transformation is now well established as a lateral gene transfer mechanism shared by *Acinetobacter* spp., no study had shown the ability of the *mcr* genes to be transferred by natural transformation.

Due to the mechanism of action of MCR enzymes that encode for a phosphoethanolamine transferase that alters the lipid A of outer membrane by addition of phosphoethanolamine groups to lipopolysaccharide reducing its overall negative charge, it was hypothesized that colistin resistant strains could be less virulent. Some studies showed that colistin resistance was associated with less virulence²¹, while others reported increased virulence *in vivo*, highlighting that colistin resistance is mechanistically very complex and strain specific^{22,23}.

Acquisition of *mcr* genes by HGT can affect the virulence of the strain. The formation of biofilms is considered a virulence feature of a strain. Moreover, HGT events can occur more frequently in biofilms than among planktonic bacteria²⁴⁻²⁷.

Biofilm formation is a bacterial survival strategy, an adaptive response to the constant changing and potentially hostile environments^{28,29}. Bacterial biofilms are organized microbial colonies adherent to a biotic or abiotic surface, encased in a self-synthesizing extracellular polymeric material that includes exopolysaccharides, matrix proteins, and extracellular DNA³⁰. Bacteria in biofilms can tolerate better both host defences and antibiotics and disinfectants when compared with microorganisms that grow as planktonic bacteria. Bacterial biofilm development greatly increases antibiotic resistance, complicates infection therapy, and increases the risk of relapse³¹. Considering the relevance of the epidemiology of *mcr*-genes in the context of public health, and knowing that in *Acinetobacter* spp. the acquisition of *mcr* gene is not always explained by conjugation, the main goal of this study was to assess the role of natural transformation in the dissemination of *mcr* between genetically unrelated bacterial species. Biofilm formation was also assessed in bacteria carrying the *mcr-1* gene.

5.3. Material and Methods

5.3.1. Bacterial Isolates

The strains used in this study were collected from retail meat and animals of intensive farming production, as reported previously ^{8,32}. Six *mcr-I* positive *E. coli* isolates isolated from swine, poultry and rabbit samples ⁸ and two *mcr-I* harbouring *S. enterica* Typhimurium isolates, Sal25 and Sal90 ³², were selected as donor DNA strains. *Acinetobacter baylyi* BD413 was used as a recipient strain in natural transformation assays (Table 5.1) ³³.

Table 5.1. Bacterial isolates used in natural transformation assays.

Isolate	Specie	Year of Isolation	Source of Isolation	Resistance Genes/markers	Role in Natural Transformation Assays
166	<i>E. coli</i>	2018	Fowl carcasse	<i>mcr-I</i> ; <i>bla</i> _{TEM-1}	DNA donor bacteria
176	<i>E. coli</i>	2017	Rabbit organs	<i>mcr-I</i>	DNA donor bacteria
185	<i>E. coli</i>	2017	Swine organs	<i>mcr-I</i>	DNA donor bacteria
186	<i>E. coli</i>	2017	Swine organs	<i>mcr-I</i> ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-15}	DNA donor bacteria
189	<i>E. coli</i>	2017	Swine organs	<i>mcr-I</i> ; <i>bla</i> _{CTX-M-1}	DNA donor bacteria
219	<i>E. coli</i>	2017	Piglet faeces	<i>mcr-I</i>	DNA donor bacteria
Sal25	<i>S. enterica</i> Typhimurium	2011	Swine retail meat	<i>mcr-I</i> ; <i>bla</i> _{CTX-M-1} ; class I integron harbouring <i>aadA1</i>	DNA donor bacteria
Sal90	<i>S. enterica</i> Typhimurium	2011	Poultry retail meat	<i>mcr-I</i>	DNA donor bacteria
BD413	<i>A. baylyi</i>			Spontaneous rifampin-resistant mutant	Recipient cell

5.3.2. DNA extraction and quantification

Both total DNA and only plasmidic DNA were used in the transformations' assays. Genomic DNA of *E. coli* 189, Sal25 and Sal90 used in the transformation assays was isolated from bacterial cultures using anion exchange columns QIAGEN Genomic tip 500/G

(QIAGEN, Germany) according to the manufacturer's protocol and resuspended in in EB buffer, pH 8.5 (QIAGEN, Germany).

The *mcr-I*-carrying plasmids were extracted from *E. coli* and *S. enterica* by the alkaline lysis method ³⁴. Briefly, *E. coli* isolates were inoculated into Luria-Bertani (LB) broth (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) overnight at 37°C. Then, 15 mL of these cultures were centrifuged and resuspended in 500 µL of TE buffer, and 500 µL of NaOH 0,4M and 500 µL of 20% SDS solutions were added to each tube. After standing on ice for 5 minutes, 750 µL of potassium acetate solution 5M, pH 4.8 at 4°C was added. Tubes were placed on ice again and then centrifuged. The DNA was extracted with phenol-chloroform and was precipitated with 100% ethanol solution at -20°C. After washing the DNA with 70% ethanol solution, it was dried and resuspended in 100 µL of EB buffer with 5 µL of RNase (1 mg/mL). The DNA was quantified with the Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

5.3.3. Natural Transformation Assays

Natural transformation assays were performed on nitrocellulose filters (Merck-Millipore, Tullagreen, Carrigtwohill, County Cork, Ireland) placed on LB agar surfaces, using the naturally competent *A. baylyi* BD413 as a recipient cell ¹⁶, since this is the standard described method for assays with the recipient cell that was used ³³. In brief, *A. baylyi* BD413 competent cells were grown in LB broth at 30°C until the OD_{600nm} reaches 0.6. An aliquot of 80 µL containing 1.0×10^8 competent cells was mixed by vortexing with 10 µg of each donor DNA. This mix was applied to the centre of each sterile filter on antibiotic-free and on 0.4 mg/L colistin-containing LB agar plates (*A. baylyi* BD413 colistin sub-inhibitory concentration). The transformation reactions were incubated for 24h at 30°C; bacteria were removed from the filter by vortexing for 60s in a tube containing 4 mL of 0.85% of NaCl followed by selection on LB agar supplemented with 12 mg/L of colistin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 30°C for 2-3 days or until the Colony Forming Units (CFUs) were sufficiently large for enumeration.

The transformation frequency (TF) was calculated as the ratio between the number of transformants and the total number of cells. Negative controls were always included in each transformation experiment, using sterile water instead of donor DNA. A minimum of

three independent transformation experiments, each repeated in triplicate, were performed.

5.3.4. Transformants Characterization

The CFUs that grew on supplemented LB plates were considered possible transformants. Selected cells were re-streaked onto colistin-containing LB agar and tested by PCR targeting the *mcr-1*, *bla*_{CTX-M} and/or class I integron¹⁶, using the DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and minimal inhibitory concentrations of possible transformants for colistin, cefotaxime and/or streptomycin were determined by the broth microdilution method according to EUCAST recommendations

35

5.3.5. Detection of Biofilm Formation Ability

To analyse the ability of biofilm formation, we used isogenic bacteria: *E. coli* J53 transconjugants and the recipient (see capítulo II, for methods). Using 96 micro well plates biofilm formation assays were performed to determine the capacity to grow as biofilm following a previously described protocol^{36,37}. Briefly, *E. coli* 185, *E. coli* 186 and *E. coli* 189 and their transconjugants obtained in conjugations assays using *E. coli* J53 as recipient cell, as reported in previous study⁸, were grown overnight at 37°C in 8 mg/L colistin-containing LB agar. After the incubation, a single CFU of each culture was transferred to 5 mL LB broth, and posteriorly was incubated at 37°C for 24h at 150 rotations per minute (rpm) in an orbital shaker (New Brunswick Scientific CO., USA). The inoculum with a turbidity identical to 0.5 McFarland standard was obtained by adding a few drops of bacterial suspension to 5 mL of fresh LB broth and measuring in a McFarland Densitometer (DEN-1 B, Biosan, EU). Then, 200 µL of each suspension were added to a 96-well polystyrene flat-bottom microtiter plates (Biosigma, Italy), as well as 200 µL of LB broth for a sterility control. The plates were incubated at 37°C for 24h at 150 rpm. After 24h of incubation, the supernatant containing planktonic cells was removed by turning the plate and the wells were washed once with milliQ water, followed by inversion of the plate and air dry for 5min. Following this, 200 µL of 99% (v/v) ethanol (VWR Chemicals, France) were added to each well for 15min for fixation, the supernatant was removed by inverting the plate and

air dried for 5min. Two hundred μL of a solution of 1% of crystal violet (Applichem, Germany) was added to each well and incubated at room temperature for 20min, and the excess of crystal violet was removed by inverting the plate. The plate was then rinsed two to three times with milliQ water and dried completely. To each well were added 200 μL of 33% (v/v) acetic acid (Pronalab, 14 Portugal), in order to solubilize the dye and biofilm biomass, followed by 1min homogenization of the plate in an orbital shaker. Subsequently, each well was transferred to a new 96 well microtiter plate. The absorbance at 590 nm was measured using a microplate reader (Synergy HT, BioTek, USA). The assay was performed in triplicate and was repeated independently five times.

5.4. Results and Discussion

The mobilization of *mcr-1* gene by natural transformation did not occur when genomic DNA of *E. coli* and *Salmonella* isolates was used. The *mcr-1* gene was successfully transferred to *A. baylyi* BD413 by natural transformation at frequency of $6,8 \times 10^{-8}$ to $1,2 \times 10^{-7}$ cells per recipient when plasmidic DNA of *E. coli* 189 and Sal25 was used as donor, respectively. Furthermore, *bla*_{CTX-M-1} and class I integron, which were embedded into the same plasmid, were also co-transferred (Table 5.1). However, no transformants were obtained using the plasmidic donor DNA of Sal90, *E. coli* 166, *E. coli* 176, *E. coli* 185, *E. coli* 186 and *E. coli* 219. These results show that antibiotic resistance-encoding *mcr-1* and *bla*_{CTX-M-1} genes and integrons can be horizontally transferred by natural transformation between genetically divergent species, namely *Acinetobacter* spp. and the *Enterobacteriales*, *Salmonella enterica* and *E. coli*, but there might be strain variability influencing the acquisition of the foreign DNA.

The natural transformation of *Acinetobacter* cells is influenced by several factors. Depending on the transforming DNA type (plasmid versus chromosomal DNA), some studies found variations in the natural transformability of *Acinetobacter* isolates^{33,38,39}. In fact, natural transformation has been recognized as one of the main mechanisms of HGT¹⁶, though its relevance in antimicrobial resistance spread among clinical strains remains relatively unexplored. Nevertheless, to the best of our knowledge, there are no studies that show the involvement of natural transformation in the dissemination of *mcr* genes. This HGT ability can explain the increased antimicrobial resistance seen in *Acinetobacter* species in the last decades, albeit colistin resistance conferred by *mcr* genes is not frequently

reported in *Acinetobacter* spp.¹⁹. Our experiments showed, for the first time, that *mcr-I* gene can be mobilized by natural transformation. Nevertheless, this event occurred at low transformation frequencies, and only when plasmid DNA was used, i.e., without interference from high genetically divergent chromosomal DNA. Increased genetic divergence reduces transformation frequency in *Acinetobacter*⁴⁰. Contrary to what is commonly advocated, the antibiotic pressure exerted by the sub-inhibitory concentrations of colistin used in the same experiments of this study does not seem to be the driving force for the acquisition of colistin resistance genes by natural transformation. In HGT by plasmid conjugation, colistin at sub-inhibitory concentrations seems to increase the conjugation frequencies of *mcr-I*- and *bla*_{NDM-5}-positive plasmids⁴¹.

Until this study, only the *mcr-5* gene detected in an *Aeromonas hydrophila* isolate from swine was shown to be transferred by natural transformation to a colistin susceptible strain of *Aeromonas hydrophila*. Natural transformation is a general property of environmental isolates of *Aeromonas* spp. and therefore, in this case, the *mcr-5* gene showed potential to be transferred between aquatic species of *Aeromonas*⁴².

The acquisition of these resistance determinants by natural transformation, though at low frequency, might contribute for the emergence and spread of antibiotic resistant bacteria in clinical and animal production environments, since all the transformants were classified as resistant to colistin, cefotaxime and streptomycin, according to the genotype transferred, with MIC values of 8, >512 and 256 mg/L, respectively; the *mcr-I*-positive transformants had a MIC of 8 mg/L for colistin, at least 16-fold higher than the control recipient (MIC <0.5 mg/L). The acquired resistance is subsequently transferred vertically to the offspring, increasing the dissemination of the resistant genes.

Biofilm formation has been associated with bacterial fitness advantage by strengthening their capacity to survive, increasing their virulence, and making it easier for them to acquire virulence and antibiotic resistance genes through HGT⁴³. Biofilm may have a substantial impact on resilience and duration of bacterial infections, being refractory to antibiotic therapy⁴⁴. In our study, the ability for biofilm formation of *mcr-I*-positive *E. coli* isolated from swine production and their transconjugants was evaluated. Overall, *mcr-I*-positive strains are able to form more biofilm when compared with colistin susceptible *E. coli* J53 strain, as shown in Figure 5.2.

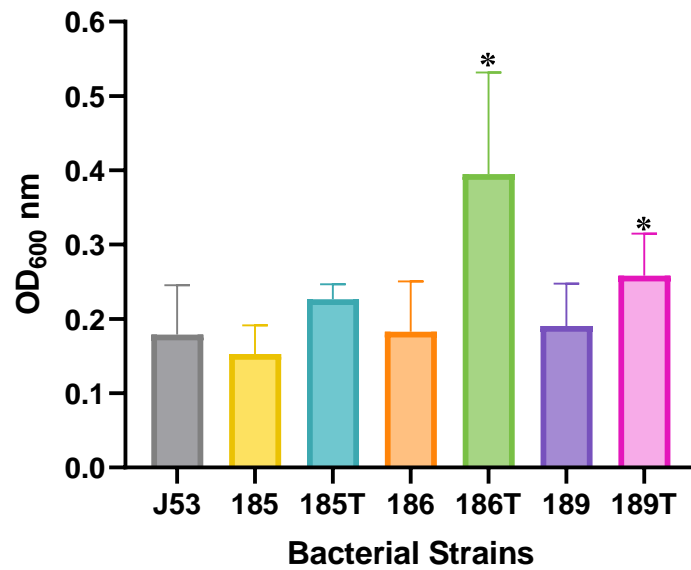


Figure 5.2. Biofilm formation ability of *mcr-I*-positive *E. coli* and its transconjugants compared with *E. coli* J53. * $p < 0.05$.

Furthermore, transconjugants 186T and 189T showed significantly increased ability of biofilm formation compared with the *E. coli* J53. Despite of addition of phosphoethanolamine groups to lipid A in bacterial outer membranes, the ability to form biofilm is not compromised; on the contrary, the acquisition of the *mcr-I*-carrying plasmids seems to enhance the biofilm formation. This finding may suggest that beyond *mcr-I* genes, plasmids can harbour genes associated with biofilm formation. However, in our study, the amount of biofilm produced by the donor type *mcr-I*-positive wild strains is invariably less than that of the corresponding transconjugants, although being higher than that of wild type *E. coli* J53. During conjugation process, conjugative plasmids can enhance bacterial ability to form biofilms because conjugative pili act as adhesion factors⁴⁵, but after their acquisition, plasmids appear to play a complex role in biofilm formation, not being controlled by a single factor or in a single direction, and also responding to interactions with the host chromosome⁴⁶. Previous studies not only showed that conjugative plasmids are associated with an increase in biofilm production, but also, that this ability is correlated with conjugative efficiency⁴⁶⁻⁴⁸. This statement supports previous studies insofar as of the tested transconjugant, 185T, the one whose conjugation efficiency was the lowest, was also the one that produced the least biofilm⁸.

In conclusion, natural transformation may also contribute to *mcr* gene dissemination and may explain the acquisition of *mcr* genes by *Acinetobacter* spp. carrying nonconjugative plasmids. Future molecular studies will clarify the genetic environment of the *mcr* genes and whether the plasmid was inserted into the chromosomal DNA of the recipient strain or a mobile genetic element transposed into chromosome. Moreover, acquisition of the *mcr*-bearing plasmid by bacteria increases the amount of biofilm. However, the processes behind the plasmid interactions that influence the development of biofilms are not yet clarified. Overall, acquisition of plasmid-*mcr* resistance gene is associated with virulence, which is a worrisome development.

5.5. References

1. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022;399(10325):629-655. doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0
2. Friedman ND, Temkin E, Carmeli Y. The negative impact of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(5):416-22. doi:10.1016/j.cmi.2015.12.002
3. Lima T, Domingues S, Da Silva GJ. Manure as a Potential Hotspot for Antibiotic Resistance Dissemination by Horizontal Gene Transfer Events. *Veterinary sciences*. 2020;7(3). doi:10.3390/vetsci7030110
4. World Health Organization (WHO). Critically important antimicrobials for human medicine - 6th revision. 2019.
5. Moodley A, Guardabassi L. Transmission of IncN plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(4):1709-11. doi:10.1128/AAC.01014-08
6. Lima T, Fernandes L, Matias M, et al. Longitudinal Study Detects the Co-Carriage of ESBL and *mcr-1* and *-4* Genes in *Escherichia coli* Strains in a Portuguese Farrow-to-Finish Swine Herd. *Animals (Basel)*. Aug 27 2022;12(17). doi:10.3390/ani12172209
7. Lima T, Domingues S, Da Silva GJ. Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. *Microorganisms*. Feb 19 2019;7(2). doi:10.3390/microorganisms7020055
8. Lima T, Loureiro D, Henriques A, et al. Occurrence and Biological Cost of *mcr-1*-Carrying Plasmids Co-harboring Beta-Lactamase Resistance Genes in Zoonotic Pathogens from Intensive Animal Production. *Antibiotics*. 2022;11(10):1356. doi:10.3390/antibiotics11101356
9. von Wintersdorff CJ, Penders J, van Niekerk JM, et al. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol*. 2016;7:173. doi:10.3389/fmicb.2016.00173
10. Lorenz MG, Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev*. 1994;58(3):563-602. doi:10.1128/mr.58.3.563-602.1994
11. Baur B, Hanselmann K, Schlimme W, Jenni B. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(10):3673-8. doi:10.1128/aem.62.10.3673-3678.1996
12. Bauer F, Hertel C, Hammes WP. Transformation of *Escherichia coli* in Foodstuffs. *Systematic and Applied Microbiology*. 1999;22(2):161-168. doi:10.1016/S0723-2020(99)80061-7
13. Domingues S, Rosario N, Candido A, Neto D, Nielsen KM, Da Silva GJ. Competence for Natural Transformation Is Common among Clinical Strains of Resistant *Acinetobacter* spp. *Microorganisms*. 2019;7(2). doi:10.3390/microorganisms7020030

14. Godeux AS, Svedholm E, Barreto S, et al. Interbacterial Transfer of Carbapenem Resistance and Large Antibiotic Resistance Islands by Natural Transformation in Pathogenic *Acinetobacter*. *mBio*. 2022;13(1):e0263121. doi:10.1128/mbio.02631-21
15. Ramirez MS, Don M, Merquier AK, et al. Naturally competent *Acinetobacter baumannii* clinical isolate as a convenient model for genetic studies. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(4):1488-90. doi:10.1128/JCM.01264-09
16. Domingues S, Harms K, Fricke WF, Johnsen PJ, da Silva GJ, Nielsen KM. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species. *PLoS Pathog*. 2012;8(8):e1002837. doi:10.1371/journal.ppat.1002837
17. Ruekit S, Srijan A, Serichantalergs O, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant ESKAPEE pathogens from clinical samples in Chonburi, Thailand (2017-2018). *BMC Infect Dis*. 2022;22(1):695. doi:10.1186/s12879-022-07678-8
18. Solomon FB, Wadilo F, Tufa EG, Mitiku M. Extended spectrum and metallo beta-lactamase producing airborne *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in restricted settings of a referral hospital: a neglected condition. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6:106. doi:10.1186/s13756-017-0266-0
19. Khuntayaporn P, Thirapanmethee K, Chomnawang MT. An Update of Mobile Colistin Resistance in Non-Fermentative Gram-Negative Bacilli. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:882236. doi:10.3389/fcimb.2022.882236
20. Da Silva GJ, Domingues S. Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*. 2016;4(3). doi:10.3390/microorganisms4030029
21. Vila-Farres X, Ferrer-Navarro M, Callarisa AE, et al. Loss of LPS is involved in the virulence and resistance to colistin of colistin-resistant *Acinetobacter nosocomialis* mutants selected in vitro. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015;70(11):2981-6. doi:10.1093/jac/dkv244
22. Gerson S, Betts JW, Lucassen K, et al. Investigation of Novel *pmrB* and *eptA* Mutations in Isogenic *Acinetobacter baumannii* Isolates Associated with Colistin Resistance and Increased Virulence In Vivo. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019;63(3)doi:10.1128/AAC.01586-18
23. Espinal P, Pantel A, Rolo D, et al. Relationship Between Different Resistance Mechanisms and Virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Microbial drug resistance*. 2019;25(5):752-760. doi:10.1089/mdr.2018.0182
24. Hausner M, Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Applied and environmental microbiology*. 1999;65(8):3710-3. doi:10.1128/AEM.65.8.3710-3713.1999
25. Stalder T, Top E. Plasmid transfer in biofilms: a perspective on limitations and opportunities. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2016;2. doi:10.1038/npjbiofilms.2016.22
26. Nolan LM, Turnbull L, Katrib M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* is capable of natural transformation in biofilms. *Microbiology*. 2020;166(10):995-1003. doi:10.1099/mic.0.000956

27. Madsen JS, Burmolle M, Hansen LH, Sorensen SJ. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;65(2):183-95. doi:10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x
28. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):95-108. doi:10.1038/nrmicro821
29. Lerner A, Matthias T, Aminov R. Potential Effects of Horizontal Gene Exchange in the Human Gut. *Front Immunol.* 2017;8:1630. doi:10.3389/fimmu.2017.01630
30. Yin R, Cheng J, Wang J, Li P, Lin J. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infectious biofilms: Challenges and strategies. *Front Microbiol.* 2022;13:955286. doi:10.3389/fmicb.2022.955286
31. Yan J, Bassler BL. Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host Microbe.* 2019;26(1):15-21. doi:10.1016/j.chom.2019.06.002
32. Figueiredo R, Card RM, Nunez J, et al. Detection of an *mcr-1*-encoding plasmid mediating colistin resistance in *Salmonella enterica* from retail meat in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2338-40. doi:10.1093/jac/dkw240
33. Ray JL, Nielsen KM. Experimental methods for assaying natural transformation and inferring horizontal gene transfer. *Methods in enzymology.* 2005;395:491-520. doi:10.1016/s0076-6879(05)95026-x
34. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;7(6):1513-23. doi:10.1093/nar/7.6.1513
35. Doumith M, Day MJ, Hope R, Wain J, Woodford N. Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of clinical microbiology.* 2012;50(9):3108-10. doi:10.1128/JCM.01468-12
36. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods.* 2008;72(2):157-65. doi:10.1016/j.mimet.2007.11.010
37. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000;40(2):175-9. doi:10.1016/s0167-7012(00)00122-6
38. Wilharm G, Piesker J, Laue M, Skiebe E. DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *J Bacteriol.* 2013;195(18):4146-53. doi:10.1128/JB.00754-13
39. Godeux AS, Lupo A, Haenni M, et al. Fluorescence-Based Detection of Natural Transformation in Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* 2018;200(19). doi:10.1128/JB.00181-18
40. Ray JL, Harms K, Wikmark OG, Starikova I, Johnsen PJ, Nielsen KM. Sexual isolation in *Acinetobacter baylyi* is locus-specific and varies 10,000-fold over the genome. *Genetics.* 2009;182(4):1165-81. doi:10.1534/genetics.109.103127
41. Xiao X, Zeng F, Li R, Liu Y, Wang Z. Subinhibitory Concentration of Colistin Promotes the Conjugation Frequencies of *Mcr-1*- and *bla_{NDM-5}*-Positive Plasmids. *Microbiol Spectr.* 2022;10(2):e0216021. doi:10.1128/spectrum.02160-21

42. Ma S, Sun C, Hulth A, et al. Mobile colistin resistance gene *mcr-5* in porcine *Aeromonas hydrophila*. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(7):1777-1780. doi:10.1093/jac/dky110
43. Bowler P, Murphy C, Wolcott R. Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020;9(1):162. doi:10.1186/s13756-020-00830-6
44. Bridier A, Sanchez-Vizueté P, Guilbaud M, Piard JC, Naitali M, Briandet R. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol*. 2015;45(Pt B):167-78. doi:10.1016/j.fm.2014.04.015
45. Lim JY, La HJ, Sheng H, Forney LJ, Hovde CJ. Influence of plasmid pO157 on *Escherichia coli* O157:H7 Sakai biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(3):963-6. doi:10.1128/AEM.01068-09
46. Gama JA, Fredheim EGA, Cleon F, Reis AM, Zilhao R, Dionisio F. Dominance Between Plasmids Determines the Extent of Biofilm Formation. *Front Microbiol*. 2020;11:2070. doi:10.3389/fmicb.2020.02070
47. Reisner A, Holler BM, Molin S, Zechner EL. Synergistic effects in mixed *Escherichia coli* biofilms: conjugative plasmid transfer drives biofilm expansion. *J Bacteriol*. 2006;188(10):3582-8. doi:10.1128/JB.188.10.3582-3588.2006
48. Ghigo JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*. 2001;412(6845):442-5. doi:10.1038/35086581

CAPÍTULO VI

Conclusões Gerais e Perspetivas Futuras

Conclusões Gerais e Perspetivas Futuras

A utilização inadequada de antibióticos tem contribuído para o desenvolvimento de resistência bacteriana, que apesar de ser um fenómeno natural tem sofrido acelerada expansão nos últimos anos, em resultado da pressão seletiva exercida pelo seu uso.

O uso de antibióticos em sistemas de criação intensiva de animais produtores de alimento, nomeadamente o ceftiofur e a colistina, exercem pressão seletiva sobre a microbiota intestinal dos animais, contribuindo para o aumento dada prevalência de genes *bla*_{CTX-M} e *mcr* em bactérias do microbiota intestinal, como *Escherichia coli*. Estes determinantes de resistência estão frequentemente associados a EGM, como plasmídeos, os quais podem transportar vários genes de resistência, como documentado nos resultados deste trabalho. Neste caso, mesmo que retirada a colistina, a administração de outro antibiótico, como por exemplo o ceftiofur, uma cefalosporina de terceira geração usada apenas em medicina veterinária, vai não só selecionar as bactérias portadoras do gene *bla*_{CTX-M}, mas também o plasmídeo com os genes *mcr*. Deste modo, o plasmídeo mantém-se na população bacteriana, com elevado potencial de disseminação podendo atingir possíveis patógenos humanos.

Embora o gene *mcr-4* tenha sido pela primeira vez descrito em 2017 em amostras provenientes de suínos, um novo alelo deste gene foi identificado neste estudo, em isolados de *E. coli* produtores de *mcr-1* obtidos em 2011. Este resultado, constituiu não só a primeira identificação do gene *mcr-4* em Portugal, mas também de uma nova variante do gene, que se denominou *mcr-4.7*. Também se verificou a sua coocorrência com o gene *mcr-1* e o gene *bla*_{CTX-M-1} ou *bla*_{CTX-M-32}, o que sugere que as cefalosporinas de terceira geração podem selecionar o EGM e manter a resistência à colistina na população bacteriana.

Embora, por um lado, um elevado número de isolados de *S. enterica* descritos neste estudo tenha crescido na presença de 3,5 mg/L de colistina e, por outro lado, o gene *mcr-1* tenha sido previamente detetado em isolados de *S. enterica* provenientes de amostras de carne em Portugal em 2015¹, nenhum dos genes *mcr* descritos até ao momento (*mcr-1* a *mcr-10*) foi detetado nos isolados desta espécie obtidos neste estudo. Mecanismos de origem cromossómica, não investigados no presente estudo, poderão justificar o crescimento naquelas concentrações de colistina². Por outro lado, foi demonstrado que a real prevalência dos genes *mcr* poderá estar subestimada, uma vez que algumas bactérias fenotipicamente resistentes à colistina apresentam um crescimento mais lento, visível após

48h de incubação, realçando-se assim a necessidade de reavaliação das normas para fins epidemiológicos.

A avaliação fenotípica da suscetibilidade aos antibióticos é uma ferramenta de grande utilidade quer em termos clínicos quer em termos de vigilância epidemiológica. Contudo, e sempre que possível, os resultados fenotípicos devem ser suportados com resultados genotípicos. Tal como demonstrado neste estudo, quando a nível laboratorial não são utilizadas técnicas de sequenciação, a vigilância epidemiológica pode ser prejudicada, podendo levar à subestimação e/ou sobrestimação de determinados genes de resistência, como demonstrado neste estudo com os genes *bla*_{OXY-2} e *bla*_{CTX-M}.

O gene *mcr-1*, neste trabalho, foi, apenas, detetado em isolados de *E. coli*, uma bactéria presente na microbiota quer dos animais quer dos humanos. Provou-se que o plasmídeo contendo este gene, e contendo genes de resistência a outras classes de antibióticos é disseminável por conjugação, assim como por transformação natural. A transferência de genes *mcr* através de conjugação é um evento frequente, uma vez que os genes *mcr* são frequentemente detetados associados a plasmídeos conjugativos ou mobilizáveis. Contudo, e até à data, este foi o primeiro estudo onde se avaliou e demonstrou a possibilidade de transferência de genes *mcr* entre *Enterobacteriales* e *Acinetobacter* sp., espécies filogeneticamente divergentes, através de transformação natural. Esta particularidade assume especial relevância uma vez que estirpes clínicas de *Acinetobacter* spp. podem ser naturalmente competentes, tal como anteriormente demonstrado ³. A resistência à colistina mediada por plasmídeo pode ainda ser disseminada no ambiente, através de outras bactérias competentes, como por exemplo em produção animal e agricultura através do estrume ⁴. Deste modo, bactérias com relevância clínica para o Homem, e não só, podem adquirir tais genes de resistência. Estes genes poderão ser integrados no cromossoma da célula hospedeira tornando-se mais estáveis ⁵, permitindo assim, a sua disseminação através de transferência vertical às gerações futuras.

Ao contrário do que comumente se preconiza, a pressão antibiótica exercida por concentrações sub-inibitórias de antibióticos, neste caso a colistina, parece não constituir a força motriz para a aquisição de genes de resistência à colistina por transformação natural. Situação contrária foi anteriormente verificada em eventos de THG através da conjugação de plasmídeos, onde a colistina em concentrações subinibitórias, promoveu a aquisição de plasmídeos contendo os genes *mcr-1* e *bla*_{NDM-5}.

Devido ao custo biológico imposto pela aquisição do gene *mcr-I*, a retirada da colistina da produção intensiva de animais produtores de alimento não se traduzirá numa eliminação completa do gene de *mcr-I* numa determinada população bacteriana, dado que a reversão da resistência à colistina mediada pelos genes *mcr* não é linear, visto que a taxa de retenção do plasmídeo variou desde a sua perda completa até à sua retenção total.

Embora alguns estudos sugiram que devido às alterações provocadas no LPS, as estirpes resistentes à colistina possam apresentar diminuição da virulência ^{6,7}, neste estudo mostrou-se que a aquisição do plasmídeo portador do gene *mcr* aumenta a capacidade de produção de biofilme, uma característica de virulência.

Em suma, a retirada de um antibiótico, como a colistina, da produção animal pode reduzir a resistência numa população mas haverá sempre uma pequena fração dessa mesma população que continuará resistente. Assim, a introdução de um antibiótico na terapêutica clínica, e em especial em produção animal, deve ser bem ponderada uma vez que o não uso de um antibiótico não garante uma total reversão ao fenótipo de suscetibilidade.

Futuramente, a vigilância epidemiológica da resistência aos antibióticos em vários ambientes, em particular aos antibióticos clinicamente importantes e considerados de última linha em medicina humana, deverá continuar a ser uma prioridade, numa perspetiva One Health, uma vez que à semelhança do que aconteceu com os genes *mcr*, é através destes estudos de vigilância que na maioria das vezes, novos mecanismos de resistência e novos genes de resistência clinicamente relevantes são identificados. Relativamente a este trabalho, prevê-se um estudo molecular mais aprofundado, nomeadamente caracterizando o ambiente genético dos genes *mcr-I* aqui descritos.

A disseminação de genes *mcr* pode ocorrer em diversos ambientes e plataformas distintas. A aquisição destes genes de resistência está associada a uma maior produção de biofilme, e tendo sido provado o envolvimento da transformação natural na disseminação de genes de resistência à colistina, será importante, futuramente, avaliar o seu papel na transferência destes genes tanto em biofilmes de uma única espécie como em biofilmes mistos, uma vez que ficou documentada a transferência de genes *mcr* entre espécies geneticamente divergentes. Aliada à possibilidade de aquisição de genes *mcr* em contexto de biofilme, importará também clarificar se a aquisição destes genes por transformação natural está, tal como na conjugação, associada a uma maior produção de biofilme, ou seja, a um aumento da virulência.

Uma caracterização mais completa da virulência dos isolados portadores do gene *mcr-1* pode ajudar a determinar o seu real potencial patogénico, bem como antecipar o desenvolvimento de determinadas condições clínicas no decorrer de uma possível infeção. Assim, nesta fase, surge a necessidade de testar a virulência destes isolados em modelos *in vivo*, pelo que serão desenhados ensaios recorrendo a um modelo animal – *Galleria mellonella*, medindo a mortalidade causada pelas estirpes testadas. Outra abordagem possível será a realização de ensaios para a avaliação da sobrevivência bacteriana em macrófagos com a finalidade de perceber quais as características bacterianas que podem ser afetadas pela resistência à colistina.

Por agora, e tendo em conta o objetivo geral deste trabalho de investigação, os resultados aqui obtidos destacam a necessidade de vigilância contínua de patógenos de origem alimentar e implementação de medidas de controlo da administração de antibióticos na produção animal, uma vez que o seu uso está intimamente relacionado com o surgimento e disseminação de bactérias portadoras de genes de resistência clinicamente relevantes, os quais podem entrar na cadeia alimentar e no intestino humano. Além disso, estes resultados podem fornecer uma base para o desenvolvimento de políticas nacionais com o objetivo de orientar o gerenciamento do risco de resistência à colistina e avaliar o impacto de possíveis intervenções, seguindo uma perspectiva de Uma Só Saúde sobre a saúde animal, ambiental e pública.

6.1. Referências Bibliográficas

1. Figueiredo R, Card RM, Nunez J, et al. Detection of an *mcr-1*-encoding plasmid mediating colistin resistance in *Salmonella enterica* from retail meat in Portugal. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016;71(8):2338-40. doi:10.1093/jac/dkw240
2. Lima T, Domingues S, Da Silva GJ. Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. *Microorganisms*. 2019;7(2). doi:10.3390/microorganisms7020055
3. Domingues S, Rosario N, Candido A, Neto D, Nielsen KM, Da Silva GJ. Competence for Natural Transformation Is Common among Clinical Strains of Resistant *Acinetobacter* spp. *Microorganisms*. 2019;7(2)doi:10.3390/microorganisms7020030
4. Lima T, Domingues S, Da Silva GJ. Manure as a Potential Hotspot for Antibiotic Resistance Dissemination by Horizontal Gene Transfer Events. *Veterinary sciences*. 2020;7(3). doi:10.3390/vetsci7030110
5. Domingues S, Harms K, Fricke WF, Johnsen PJ, da Silva GJ, Nielsen KM. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species. *PLoS Pathog*. 2012;8(8):e1002837. doi:10.1371/journal.ppat.1002837
6. Yang Q, Li M, Spiller OB, et al. Balancing *mcr-1* expression and bacterial survival is a delicate equilibrium between essential cellular defence mechanisms. *Nat Commun*. 2017;8(1):2054. doi:10.1038/s41467-017-02149-0
7. Choi Y, Lee JY, Lee H, et al. Comparison of Fitness Cost and Virulence in Chromosome- and Plasmid-Mediated Colistin-Resistant *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*. 2020;11:798. doi:10.3389/fmicb.2020.00798