

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

NATALLY DOS SANTOS SILVA

BASES GENÉTICAS E GENÔMICAS DO SISTEMA REGULATÓRIO DA EXPRESSÃO
GÊNICA CrrAB DE *Citrobacter freundii* E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA À
POLIMIXINA E VIRULÊNCIA

RECIFE
2021

NATALLY DOS SANTOS SILVA

**BASES GENÉTICAS E GENÔMICAS DO SISTEMA REGULATÓRIO DA EXPRESSÃO
GÊNICA CrrAB DE *Citrobacter freundii* E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA À
POLIMIXINA E VIRULÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr Danilo Elias Xavier
Coorientadora: Dra. Nilma Cintra Leal

RECIFE – PE
2021

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

S586b Silva, Nately dos Santos.
Bases genéticas e genômicas do sistema regulatório da expressão gênica CrrAB de *Citrobacter freundii* e sua relação com a resistência à polimixina e virulência / Nately dos Santos Silva. – Recife: [s.n.], 2021.
78 p.: il., tab.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

Orientador: Danilo Elias Xavier; coorientadora: Nilma Cintra Leal.

1. *Citrobacter freundii* - efeito dos fármacos. 2. *Citrobacter freundii* - genética. 3. Polimixinas. 3. Regulação Bacteriana da Expressão Gênica. 4. Farmacorresistência Bacteriana - genética. 5. Virulência. I. Xavier, Danilo Elias. II. Leal, Nilma Cintra. III. Título.

CDU 578

NATALLY DOS SANTOS SILVA

**BASES GENÉTICAS E GENÔMICAS DO SISTEMA REGULATÓRIO DA EXPRESSÃO
GÊNICA CrrAB DE *Citrobacter freundii* RESISTENTE À POLIMIXINA E SEU PERFIL DE
VIRULÊNCIA.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Biotecnologia em Saúde do Instituto
Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como um
dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Aprovada em: 10/03/2021

BANCA EXAMINADORA

Dr. Danilo Elias Xavier
Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE)

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos
Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE)

Dra. Michelle Christiane Da Silva Rabello
Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE)
Departamento de Imunologia

Dedico esse trabalho a vida da minha irmã Natiely e do meu sobrinho Arllan Gabriel que ainda durante a gestação me ensinaram, da forma mais dolorosa possível, a amplitude humana existente na problemática abordada por essa pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a espiritualidade superiora por me conceder, nessa jornada como na vida, o suporte necessário para superar as adversidades impostas.

A toda minha família em nome do meu pai, Aduino Bidon da Silva, por ser meu primeiro mestre e minha eterna fonte de inspiração e motivação.

Aos meus orientadores Dr. Danilo Elias Xavier e Dra. Nilma Cintra Leal por toda dedicação e disponibilidade para a realização deste trabalho. E de forma muito especial, a todo o grupo RestBact: Igor, Lílian, Beatriz, Rafaela e José Carlos pela ajuda e contribuição diária no laboratório.

Aos colegas do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), assim como ao Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz-PE e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por todos os recursos e suporte científico.

Aos membros da banca examinadora que gentilmente aceitaram o convite para contribuírem neste trabalho.

SILVA, Natally Dos Santos. **Bases genéticas e genômicas do sistema regulatório da expressão gênica CrrAB de *Citrobacter freundii* e sua relação com a resistência à polimixina e virulência.** 2021. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

RESUMO

A alta frequência de multirresistência aos antimicrobianos entre os bacilos Gram-negativos (BGNs) tem levado a uma dependência cada vez maior do uso de polimixinas, no entanto, os relatos de desenvolvimento de resistência a esses antimicrobianos são crescentes, assim como o seu uso. A modificação do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, mediada por alguns sistemas de regulação da expressão gênica conhecidos como “*two-component systems*” (TCSs) em resposta a estímulos ambientais, é reconhecida como uma das principais mecanismos de resistência às polimixinas. Essas modificações na superfície celular bacteriana e o controle da expressão de genes de virulência por TCSs também resultam em alterações na virulência e patogenicidade dos BGNs. A amostra de *Citrobacter* spp. C156 foi recuperada de líquido pleural apresentando alto nível de resistência às polimixinas. O genoma da cepa C156 foi sequenciado previamente e o fenótipo de resistência associado a mutações nos genes *crrAB*, que codificam o TCS mais recentemente descrito. CrrAB está presente na maioria dos genomas de *Klebsiella pneumoniae* e em algumas linhagens de Enterobacteriaceae. Este estudo avaliou as bases genômicas e genéticas do sistema regulatório da expressão gênica CrrAB e seu fenótipo de virulência em *Citrobacter* spp. A identificação de a nível de espécie da cepa C156 foi confirmada neste estudo como *Citrobacter freundii* por *Multilocus Phylogenetic Analysis* (MLPA). As análises filogenéticas e de sintenia demonstraram que o sistema CrrAB, assim como os demais genes que compõe a região do *locus crrAB*, ocorre de maneira variável em Enterobacteriaceae, o mesmo padrão de distribuição foi observado a nível de linhagem para a espécie *Citrobacter freundii*. As proteínas CrrA e CrrB nos genomas de *C. freundii* apresentaram motivos bastante conservados. O conteúdo GC da região do *locus crrAB* é consideravelmente menor que o conteúdo médio de *C. freundii*, e a variação do conteúdo GC dessa região da cepa C156 em comparação à média do seu genoma foi de ~10%. *crrAB* foi ainda relacionado com o mobiloma da C156, sendo identificado como região relacionada a profago. Para verificar o fenótipo de virulência da cepa C156, a cepa C156 e ATCC's de *Citrobacter* foram testadas em modelo de infecção em larvas de *Galleria mellonella*. A cepa *Citrobacter freundii* C156 apresentou uma dose-letal mediana de $4,87 \times 10^4$ UFCs/larva, uma concentração de inóculo menor quando comparada com as concentrações de LD₅₀ de $9,8 \times 10^5$ UFCs/larva e $1,07 \times 10^5$ UFCs/larva das cepas ATCC's 8090 e 43864, respectivamente. A avaliação do repertório de fatores de virulência das cepas utilizadas no ensaio de infecção demonstrou que as mesmas apresentam repertórios bastante similares. Os resultados obtidos demonstraram que a ocorrência do TCS CrrAB é variável e se dá a nível de linhagem na espécie *Citrobacter freundii*, indicando uma possível mobilidade desses genes e origem por transferência horizontal, estando na cepa C156 em uma região relacionada a profago. A resistência estável às polimixinas por mutação em TCS's em *Citrobacter* não causa perda da aptidão bacteriana, podendo apresentar uma vantagem na virulência da cepa.

Palavras chave: *Citrobacter freundii*; Colistina; Regulação da expressão gênica; Resistência; Virulência.

SILVA, Natally Dos Santos. **Genetic and genomic bases of the regulatory system for the gene expression CrrAB of *Citrobacter freundii* and its relationship with resistance to polymyxin and virulence.** 2021. Dissertation (Master of Bioscience and Biotechnology for Health) – Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2021.

ABSTRACT

The high frequency of multi-resistance to antimicrobials among gram-negative bacilli (BGNs) has led to an increasing dependence on the use of polymyxins, however, reports of the development of resistance to these antimicrobials are increasing, as well as their use. The modification of bacterial lipopolysaccharide (LPS), mediated by some systems of regulation of gene expression known as “two-component systems” (TCSs) in response to environmental stimuli, is recognized as one of the main mechanisms of resistance to polymyxins. These changes in the bacterial cell surface and the control of the expression of virulence genes by TCSs also result in changes in the virulence and pathogenicity of BGNs. The study sample *Citrobacter* spp. C156 was recovered from pleural fluid showing a high level of resistance to polymyxins. The genome of the C156 strain was previously sequenced and the resistance phenotype associated with mutations in the *crrAB* genes, which encode the most recently described system. TCS CrrAB is present in most *Klebsiella pneumoniae* genomes and in some Enterobacteriaceae strains. This study evaluated the influence of the regulatory system of gene expression CrrAB on polymyxin resistance and virulence of *Citrobacter* spp. The identification of the species level of the C156 strain was confirmed in this study as *Citrobacter freundii* by Multilocus Phylogenetic Analysis (MLPA). Phylogenetic and synteny analyzes showed that the CrrAB system, as well as the other genes that make up the *crrAB* locus region, occurs in a variable way in Enterobacteriaceae, the same distribution pattern was observed at the lineage level for the species *Citrobacter freundii*. The proteins CrrA and CrrB in the genomes of *C. freundii* showed much conserved motifs. The GC content of the *crrAB* locus region is considerably less than the average content of *C. freundii*, and the variation in the GC content of this region of the C156 strain compared to the average of its genome was ~ 10%. *crrAB* was also related to the C156 mobiloma, being identified as a region related to profago. To verify the virulence phenotype of strain C156, strain C156 and ATCC's of *Citrobacter* were tested in an infection model in *Galleria mellonella* larvae. The *Citrobacter freundii* C156 strain showed a median lethal dose of 4.87×10^4 UFCs / larva, a lower inoculum concentration when compared to LD50 concentrations of 9.8×10^5 UFCs / larva and 1.07×10^5 UFCs / larvae of ATCC's strains 8090 and 43864, respectively. The evaluation of the repertoire of virulence factors of the strains used in the infection test showed that they have very similar repertoires. The results obtained demonstrated that the occurrence of TCS CrrAB is variable and occurs at the level of lineage in the species *Citrobacter freundii*, indicating a possible mobility of these genes and origin by horizontal transfer, being in the C156 strain in a region related to pests. The stable resistance to polymyxins by mutation in TCS's in *Citrobacter* does not cause loss of bacterial fitness, and may present an advantage in the virulence of the strain.

Keywords: *Citrobacter freundii*; Colistin; Gene expression regulation; Resistance; Virulence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Relação filogenética das espécies do gênero <i>Citrobacter</i> baseados nos alinhamentos de sequências nucleotídicas concatenados dos genes <i>fusA</i> , <i>pyrG</i> , <i>leuS</i> e <i>rpoB</i>	19
Figura 2: Linha do tempo da evolução da resistência bacteriana frente a inovação terapêutica ..	26
Figura 3: Estrutura química das polimixinas B e E (colistina).	28
Figura 4: Interação dos polipeptídeos da polimixina com as membranas bacterianas.	29
Figura 5: Funcionamento e Interação dos TCSs.	32
Figura 6: Formas evolutivas do inseto <i>Galleria mellonella</i>	36
Figura 7: Esquema de preparação de inóculos e sinais de morte das larvas de <i>Galleria mellonella</i>	44
Figura 8: Processo de inoculação das larvas de <i>G. mellonella</i>	45
Figura 9: Árvore filogenética baseada no alinhamento das sequências de nucleotídeos concatenadas dos quatro genes housekeeping de cepas referências (tipo) das espécies de <i>Citrobacter</i> spp. incluindo a cepa teste C156.	47
Figura 10: Topologia da região do locus <i>crrAB</i>	49
Figura 12: Filogenia das proteínas <i>CrrA</i> e <i>CrrB</i> e das proteínas de outros TCS's envolvidas na resistência à polimixina.	51
Figura 13: Comparação da sequência de aminoácidos das proteínas <i>CrrA</i> e <i>CrrB</i>	52
Figura 14: Filogenia de 1.000 genes principais de cópia única compartilhados por 200 cepas de <i>Citrobacter</i>	53
Figura 15: Filogenia de cepas de <i>Citrobacter freundii</i> de acordo com o ST.	54
Figura 16: Composição da região de profago.	55
Figura 17: Porcentagem de diferença do conteúdo GC da região	56
Figura 18: Larvas de <i>Galleria mellonella</i> em estágio final da fase larval.	58
Figura 19: Equação da LD ₅₀ das cepas <i>Citrobacter freundii</i> C156, <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864 e <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090.	59
Figura 20: Gráfico de sobrevivência das larvas infectadas com as diferentes concentrações das cepas <i>Citrobacter freundii</i> C156, <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864 e <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090.	60
Figura 21: Gráfico com os fatores de virulência das cepas do estudo.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Amostras bacterianas utilizadas neste estudo.	39
Tabela 2: Regiões de profago identificadas em <i>C. freundii</i> C156.....	57
Tabela 3: Plasmídeos e seus grupos de incompatibilidade em <i>C. freundii</i> C156	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	- <i>Adenosine TriPhosphate</i>
BIGSdb	- <i><u>B</u>acterial <u>I</u>solate <u>G</u>enome <u>S</u>equence <u>D</u>atabase</i>
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CESP	- <i>Citrobacter, Enterobacter, Serratia e Providencia</i>
DHB- 2	- 2,5-dihidroxibenzóico
DNA	- <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ESBL	- <i>Extended Spectrum Beta-Lactamase</i>
GC	- Guanina-Citosina
IAM	- Instituto Aggeu Magalhães
IRAS	- Infecções Relacionas à Assistência à Saúde
IS	- <i>Insertion Sequence</i>
KPC	- <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
L-Ara4N	- 4-amino-4-desoxi-L-arabinose
LB	- Luria-Bertani
LPS	- Lipopolissacarídeo
LDH	- <i>Lactate DeHydrogenase</i>
MBL	- MetaloBetalactamases
MDR	- <i>Multidrug Resistent</i>
MH	- Mueller-Hinton Ágar
MLPA	- <i>Multilocus Phylogenetic Analysis</i>
MLST	- <i>Multilocus Sequence Typing</i>

PABA	- <i>P-Aminobenzoic Acid</i>
Pb	- Pares de base
PBP	- <i>Penicillin Binding Protein</i>
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PEtN	- Fosfoetanolamina
pH	- Potencial de Hidrogênio
RNA	- <i>Ribonucleic acid</i>
ST	- <i>Sequence Types</i>
TCS	- <i><u>T</u>wo-<u>c</u>omponent <u>s</u>ystems</i>
Tir	- <i>Translocated intimin receptor</i>
TccP	- <i>Translocated receptor-cytoskeleton coupling protein</i>
T6SS	- <i>Type VI Secretion System</i>
T1SS	- <i>Type I Secretion System</i>
UFC	- Unidade Formadora de Colônias
UTI	- Unidade de Tratamento Intensivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Ordem Enterobacterales	17
2.2 Gênero <i>Citrobacter</i>	18
2.2.1 Virulência e patogenicidade.....	20
2.2.2. Tratamento das infecções causadas por <i>Citrobacter</i> e mecanismos de resistência aos antimicrobianos.....	21
2.3 Classe das polimixinas	27
2.3.1 Mecanismos de resistências às polimixinas	30
2.4 Filogenia do sistema CrrAB	33
6 OBJETIVOS	38
6.1 Objetivo geral	38
6.2 Objetivos específicos	38
7 MATERIAL E MÉTODOS	39
7.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo	39
7.2 Multilocus Phylogenetic Analysis	40
7.3 Teste de sensibilidade à polimixina B	40
7.4 Sintenia genética do locus de <i>crrAB</i> em Enterobacteriaceae	41
7.5 Filogenia de CrrAB e outros <i>Two Component Systems</i>	41
7.6 Relação filogenética de cepas de <i>Citrobacter</i>	41
7.5 Análise do mobiloma da cepa <i>Citrobacter</i> C156	42
7.6 Modelos de infecção <i>in vivo</i> em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	42
7.7 Identificação <i>in silico</i> dos fatores de virulência	45
8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	46
9 RESULTADOS	47
9.1 Identificações da espécie da cepa <i>Citrobacter</i> C156 por <i>Multilocus Phylogenetic Analysis</i>	47

9.2 Suscetibilidade à polimixina	48
9.3 Caracterização do contexto genético de <i>crrAB</i> em Enterobacteriaceae.....	48
9.4 Relação filogenética de CrrAB e outros <i>Two Component Systems</i> de Enterobacteriaceae	50
9.5 Relação filogenética de cepas de <i>Citrobacter</i> spp.....	52
9.6 Análise do mobiloma da cepa <i>Citrobacter freundii</i> C156	55
9.7 Análise de sobrevivência e determinação da LD50 em modelo de infecção de larvas de <i>Galleria mellonella</i>	57
9.7 Identificação <i>in silico</i> dos fatores de virulência.....	61
10. DISCUSSÃO.....	63
11. CONCLUSÕES	68
12. REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Citrobacter* é composto por bacilos Gram-negativos fermentadores de glicose e lactose, anaeróbios facultativos, pertencentes à ordem Enterobacterales e Família Enterobacteriaceae. São comumente encontrados no meio ambiente, alimentos e trato intestinal de animais e humanos. Anteriormente eram considerados contaminantes ambientais ou colonizantes não patogênicos, porém, ultimamente tem emergido como patógenos oportunistas e cada vez mais reconhecidos como o agente etiológico de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), causando infecções da corrente sanguínea, meningite, infecções peritoneais, urinárias, gastrointestinais e respiratórias, frequentemente relatados em pacientes imunocomprometidos e em unidades de terapia intensiva (UTI).

Da mesma forma que em outras espécies da Família Enterobacteriaceae, os relatos de resistência aos antimicrobianos de uso clínico são inúmeros e cada vez mais frequentes em *Citrobacter* spp. Recentemente a presença do gene *mcr-1*, que confere resistência às polimixinas, foi relatada em *Citrobacter freundii*, além dos outros diversos genes de resistência a múltiplas classes de antimicrobianos detectados, indicando a espécie como um possível reservatório de genes de resistência e emergente problema de saúde pública.

As polimixinas são polipeptídios catiônicos que agem na parede celular bacteriana perturbando a integridade da membrana externa e levando à lise celular por meio do deslocamento de cátions como o Mg^{+2} e Ca^{+2} na porção da membrana externa correspondente ao lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas. Alterações químicas do LPS são reconhecidas como principais mecanismos de resistência às polimixinas, essas alterações resultam na redução da interação eletrostática das moléculas das polimixinas (de natureza catiônica) com o LPS (de natureza aniônica). Grupos hidrofóbicos do LPS, como os grupos fosfatos do lipídeo A, que garantem a natureza aniônica da estrutura do lipopolissacarídeo, são substituídos por açúcares ou por radicais de natureza catiônica, como a fosfoetanolamina (PEtN) ou 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N). Tais modificações ocorrem devido a mecanismos bacterianos adaptativos em respostas a condições ambientais de cultivo, como baixo pH, detecção de Fe^{+3} , baixa concentração Mg^{+2} , ou ainda na presença de peptídeos antimicrobianos.

Esses mecanismos de modificação do lipídeo A são catalisados por enzimas cuja expressão está controlada por sistemas de regulação gênica conhecidos como “*two-component systems*” (TCSs) ou sistema de regulação gênica de dois componentes, que são constituído por uma proteína transmembrana, o sensor de histidina quinase, sensível a estímulos ambientais que provocam a

autofosforilação do seu resíduo conversado de histidina; e subsequente transferência desse grupo fosfato por uma reação de transfosforilação para uma segunda proteína do sistema, a proteína reguladora de resposta, localizada no citoplasma que uma vez fosforilada é ativada para sua função de reguladora da transcrição gênica.

Na sua conformação funcional ativa, a proteína reguladora de resposta controla a expressão de genes necessários para adaptação da célula bacteriana ao meio em resposta aos estímulos ambientais, inclusive a expressão dos genes que levam a modificações químicas no LPS. No entanto, mutações nesses sistemas podem causar sua ativação constitutiva e conseqüentemente uma alteração permanente do LPS, o que leva a resistência adquirida às polimixinas, independente das condições ambientais ou de cultivo.

Estudos em Enterobacteriaceae como *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* mostram que os sistemas TCSs de regulação da expressão gênica PhoPQ e PmrAB participam da alteração do lipídeo A e da resistência às polimixinas, além da expressão da virulência, sob diferentes condições de cultivo. Mais recentemente, o sistema regulatório TCS denominado CrrAB, encontrado na maioria dos genomas de *K. pneumoniae* e em algumas linhagens de outras espécies da Família Enterobacteriaceae, foi implicado na manutenção da integridade da parede celular bacteriana, na resistência às polimixinas e na expressão da virulência em Enterobacteriaceae. Estudos realizados em cepas de *K. pneumoniae* resistentes às polimixinas revelou que mutações nos genes *crrA* e *crrB* estavam envolvidas no desenvolvimento da resistência às polimixinas e na sua patogenicidade.

A ativação constante de genes envolvidos nos processos de desenvolvimento de resistência às drogas gera um grande custo energético podendo comprometer funções biológicas importantes para as bactérias, como o comprometimento da sua aptidão, além dos seus fatores de virulência. Porém, a crescente ameaça de bactérias resistentes aos antimicrobianos contradiz esse dogma e insinua que a evolução da resistência pode estar associada a uma manutenção ou até vantagem física da bactéria durante infecções *in vivo* e que os mecanismos de alterações do LPS podem influenciar no estabelecimento de infecções por patógenos bacterianos.

A cepa de *Citrobacter*, nomeada C156, foi isolada apresentando alto nível de resistência às polimixinas de uma infecção invasiva do trato respiratório inferior de um paciente hospitalizado. O sequenciamento do genoma da cepa de C156 e estudos genômicos anteriores associou o fenótipo de resistência às polimixinas à substituição de uma alanina por treonina na posição 91 (A91T), na interface do domínio HAMP da proteína CrrB, sensor de histidina quinase do TCS CrrAB, não sendo identificado nenhuma outra mutação deletéria a função de outros determinantes de resistência às polimixinas. Foi relatado também se tratar de uma nova ST, a

ST117 (ARAÚJO, 2018). Apesar de raros, os relatos de *Citrobacter* resistente às polimixinas se apresentam de forma crescente e de maneira similar aos mecanismos de resistência relatados em *K. pneumoniae*. O presente estudo tem por objetivo avaliar as bases genômicas e genéticas do sistema regulatório da expressão gênica CrrAB e sua possível influência no fenótipo de virulência de *Citrobacter* spp. *In vivo* em modelo animal de larvas do inseto *Galleria mellonella*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ordem Enterobacterales

A ordem Enterobacterales, da classe Gammaproteobacteria, é uma grande e heterogênea coleção de bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos, encontrados em nichos ecológicos diferentes como: solo, na água e em associação com organismos vivos, incluindo plantas, insetos, animais e humanos. Muitos membros da ordem têm sido implicados como patógenos em humanos e animais, como a espécie *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Yersinia pestis*. A ordem é composta ainda por composta por sete famílias: Enterobacteriaceae, Erwiniaceae, Pectobacteriaceae, Yersiniaceae, Hafniaceae, Morganellaceae e Budviciaceae (ADEOLU *et al.*, 2016). Entre as famílias que pertencem à ordem, a família Enterobacteriaceae é a mais diversa, compreendendo 53 gêneros, 348 espécies e 71 subespécies (), que, de modo geral, são bacilos de tamanho moderado (aproximadamente 0,3 a 1,0 x 1,0 a 6,0 µm), a maioria são móveis e apresentam flagelos peritríquios, não formam esporos, são aeróbias ou anaeróbias facultativas, fermentam açúcares e reduzem o nitrato a nitrito, são catalase positiva, oxidase negativa e contém 39% -59% guanina-citosina (GC) em seu DNA (ANDRADE, 2008).

As bactérias componentes dessa família são consideradas ubíquas, dispersos na natureza em plantas, solo e ambiente aquático, como comensais são encontradas na mucosa intestinal de seres humanos e animais. As infecções causadas por espécies da Família Enterobacteriaceae podem originar-se a partir de uma fonte ambiental, animal ou ainda por meio da disseminação endógena, uma vez que algumas espécies dessa família compõem a microbiota de animais, inclusive humanos (MITHARWAL *et al.*, 2016; PATERSON, 2011).

Enterobacteriaceae de interesse médico, são divididas em patógenos oportunistas que podem causar um quadro infeccioso em imunocomprometidos e patógenos primários que apresentam potencialmente a capacidade de causar a infecção e juntos compõem cerca de 80% das espécies de BGNs de importância médica e aproximadamente 50% de todas as bactérias isoladas em laboratórios de microbiologia (WANG *et al.*, 2019).

Vários membros da Família podem causar infecções oportunistas, incluindo septicemia, pneumonia, meningite e infecções do trato genito-urinário. Como exemplo de gêneros que podem causar essas infecções citadas, *Klebsiella* spp., *E. coli* e *Enterobacter* spp. são as enterobactérias que frequentemente causam meningite, resultando em alta taxa de mortalidade decorrente da patogenicidade e resistência aos antimicrobianos que essas bactérias possuem (WANG *et al.*, 2019; JIANG, 2019). *Proteus mirabilis* também é um dos BGNs mais encontrados em amostras

clínicas, causando infecções na comunidade e em pacientes hospitalizados, tais como sepse e infecção urinária (JACOBSEN *et al.*, 2008). *Serratia marcescens* pode causar infecções oportunistas, tipicamente em pacientes com granulocitopenia e imunocomprometidos por doença ou terapia (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Espécies do gênero *Citrobacter*, por sua vez, são patógenos oportunistas, presentes na microbiota intestinal de animais, inclusive humanos, associados a uma série de infecções, como infecções do trato urinário, gastroenterites, meningites, abscessos cerebrais e endocardites, especialmente em neonatos e imunocomprometidos. Entre as espécies, *Citrobacter freundii* é a mais comumente identificada como agente etiológico de infecções, outras espécies como *C. youngae* e *C. braakii* raramente estão associadas a quadros infecciosos. (LIU *et al.*, 2017).

2.2 Gênero *Citrobacter*

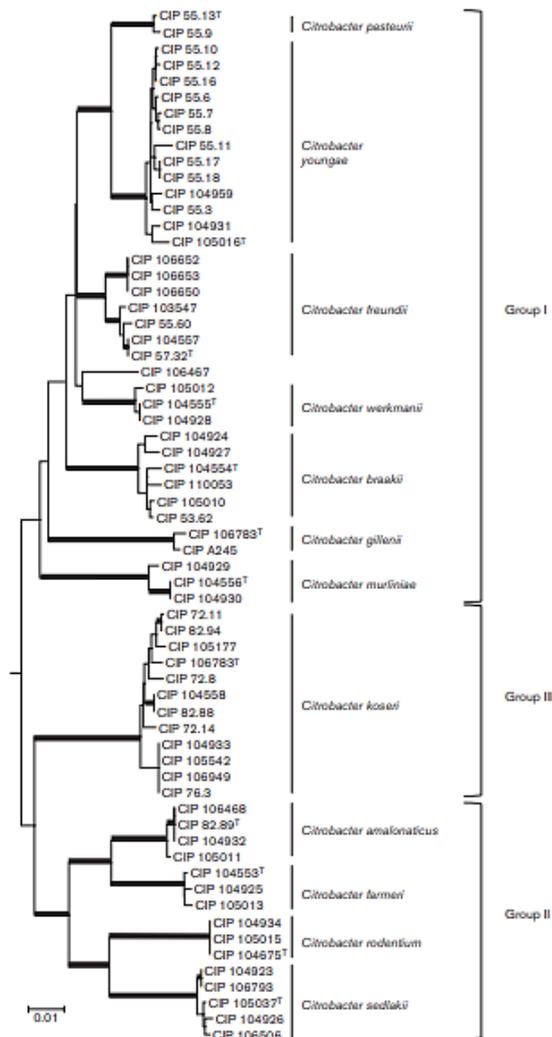
O gênero *Citrobacter* foi assim nomeado por suas espécies apresentarem a capacidade de usar o citrato como sua única fonte de carbono. De modo geral, os representantes desse gênero são bacilos Gram-negativos fermentadores de glicose e lactose, capazes de produzir ácido e gás, são oxidase negativo, catalase positivo, reduzem nitrato a nitrito, são anaeróbicos facultativos, não esporulados e não descarboxilam lisina, além de apresentarem flagelos peritríquios (QIAN *et al.*, 2018; ANDERSON *et al.*, 2018).

Várias espécies de *Citrobacter* são consideradas patógenos oportunistas, que se apresentam em uma frequência relativamente menor em relações a outros isolados clínicos de Enterobacteriaceae; porém, têm sido cada vez mais isolados em um amplo espectro de infecções, incluindo infecções do trato urinário, pneumonia, abscessos, septicemia, meningite, abscesso cerebral, endocardite, intoxicação alimentar, infecções pós-operatórias, especialmente em grupos de alto risco, como neonatos, crianças com menos de seis anos de idade e idosos (QIAN *et al.*, 2018; ANDERSON *et al.*, 2018).). A espécie *C. freundii* é a mais comumente isolada em ambientes hospitalares do gênero, seguida por *C. youngae* e o *C. braakii* (LIU *et al.*, 2017).

Citrobacter compõe o grupo CESP, que consiste em um grupo de bactérias pertencentes aos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Providencia*, e mais recentemente, os gêneros *Morganella* e *Hafnia*. Anteriormente classificados apenas como microrganismos comensais e que atualmente são reconhecidos como responsáveis por graves infecções e problemas de saúde em todo o mundo, principalmente em pacientes imunocomprometidos (SANTOS *et al.*, 2015).

O gênero foi descrito em 1932 juntamente com a espécie *C. freundii*, sua única representante até 1970, quando foi descrita a espécie *C. koseri*, seguida da espécie *C. diversus*, em 1972. Anos mais tarde estudos revelaram que estas duas estirpes eram fenotipicamente semelhantes e foi proposto o nome de *C. koseri* para classificar as duas linhagens analisadas. Atualmente, o gênero *Citrobacter* compreende a espécie *C. farmeri*, *C. braakii*, *C. freundii*, *C. koseri* (*diversus*), *C. amalonaticus*, *C. gilleni*, *C. murlinae*, *C. rodentium*, *C. sedlakii*, *C. werkmanii*, *C. youngae*, *C. pasteurii*, *C. bitternis*, *C. europaeus* e *C. portucalenses*, relacionadas filogeneticamente baseadas em sequências de rRNA 16S em três grupos: grupo I composto por *C. freundii*, *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmanii*, *C. gilleni* e *C. murlinae*; grupo II composto por *C. amalonaticus*, *C. farmeri*, *C. sedlakii* e *C. rodentium*; e grupo III composto por *C. koseri*. (CLERMONT *et al.*; KO *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2017).

Figura 1: Relação filogenética das espécies do gênero *Citrobacter* baseados nos alinhamentos de sequências nucleotídicas concatenados dos genes *fusA*, *pyrG*, *leuS* e *rpoB*.



Fonte: Clermont *et al.* (2015).

2.2.1 Virulência e patogenicidade

Os fatores de virulência englobam tanto os atributos físicos, constituintes das bactérias como flagelos, *pili*, fímbrias, biofilme, cápsula; quanto fatores bioquímicos, incluindo enzimas modificadoras da superfície da célula hospedeira, toxinas e antibióticos que proporcionam vantagem adaptativa e competitiva (SCHROEDER; BROOKS; BROOKS, 2017). Tais mecanismos em associação produzem a patogênese no hospedeiro.

O mecanismo de adesão a células é um fator de virulência essencial auxiliado por estruturas bacterianas como flagelos, *pili* e fímbrias. Estudos em modelo murino demonstram que a espécie *Citrobacter rodentium*, durante o estabelecimento da infecção, penetra a mucosa e se liga intimamente às células epiteliais intestinais, iniciando a etapa de expansão da infecção e desencadeando uma resposta imune celular. O receptor de intimina translocado (Tir), a intimina (Eae) e a proteína de acoplamento do citoesqueleto de Tir (TccP) representam três fatores de virulência implicados na ligação íntima das bactérias à célula eucariótica (MULLINEAUX-SANDERS *et al.*, 2019).

O mesmo foi descrito em outras espécies de *Citrobacter* em um estudo realizado por Liu e colaboradores (2017) que observou adesão moderada à forte de cepas das espécies *Citrobacter youngae* e *C. freundii*, de origem alimentar e humana, a células de carcinoma hepidermóide HEP-2. No mesmo estudo foi observada forte citotoxicidade medida pela quantidade de lactato desidrogenase (LDH) liberado pelas células HEP-2 durante a infecção por estas cepas testadas (LIU *et al.*, 2018).

O sistema de secreção do tipo VI (T6SS) é um mecanismo de virulência que auxilia a translocação de proteínas efetoras para a célula hospedeira mediante a sua ativação que ocorre por meio do contato com as células. Em *Citrobacter*, o sistema T6SS e suas principais proteínas, ClpV, uma ATPase que forma complexos oligoméricos para gerar energia para o sistema e as proteínas efetoras Hcp-2 e Vgr, atuam também na regulação do sistema flagelar e no aumento da mobilidade, além de estar envolvido com a adesão e citotoxicidade (Yuan *et al.*, 2019). Outros sistemas de secreção também podem ser encontrados no gênero, como a presença do sistema T1SS que foi descrito em *C. freundii* (BAI *et al.*, 2012).

A produção de toxinas é um dos principais fatores de virulência de patógenos entéricos bacterianos. As toxinas do tipo Shiga, toxinas estáveis ao calor e até a presença do gene *ctxAB* que codifica a toxina da cólera, foram identificados em cepas de *C. freundii*. Outras espécies de *Citrobacter* também podem produzir proteases, enzimas proteolíticas que hidrolisam ligações peptídicas de proteínas essenciais em eucariotos; e toxinas citolíticas, como é a hemolisina HlyA

que produz um poro catalítico capaz de causar a lise das células do hospedeiro, ao mesmo tempo, níveis mais baixos de concentração de HlyA podem facilitar a sobrevivência do hospedeiro, modulando o processo de quimiotaxia dos fagócitos (VERMA *et al.*, 2019).

O antígeno Vi é um fator de virulência encontrado em *Salmonella enterica*, onde está ligado ao desenvolvimento de doenças como a febre tifoide, e também em algumas cepas de *Citrobacter freundii*. Formado por um homopolímero de ácido galactosaminurônico, está localizado na superfície capsular bacteriana onde atua modulando as respostas do hospedeiro durante a infecção por “recobrir” o antígeno O, não permitindo a aglutinação com o anticorpo específico, anti-O, evitando assim uma resposta imune inata. A sua expressão é controlada diretamente por dois *loci* cromossômicos *viaA* e *viaB* (RONDINI *et al.*, 2012).

Espécies do gênero *Citrobacter* podem apresentar ainda a capacidade de forma biofilme, que são populações bacterianas coordenadas fechadas em uma matriz polissacarídica onde se aderem umas às outras e a superfícies bióticas ou abióticas, com o auxílio e flagelos, fímbrias e *pili*. A própria estrutura tridimensional do biofilme já é considerada um fator de virulência por promover o aumento da resistência aos estresses ambientais e ter o processo de formação acelerado diante desses estresses, assim que o biofilme é estabelecido, ocorre ainda a regulação sincronizada de genes de virulência dentro do biofilme por *quorum sensing* e/ou TCSs (ZHOU *et al.*, 2017; SCHROEDER; BROOKS, 2017; ANDREASEN *et al.*, 2019).

Genes codificadores de um ou mais dos determinantes de virulência, incluindo toxinas, adesinas, invasinas, sistemas de absorção de ferro (sideróforos), bem como sistemas de secreção de proteínas, têm sido identificados em elementos genéticos móveis, como ilhas genômicas de patogenicidade presentes em regiões cromossômicas de linhagens patogênicas. (ESPINOZA *et al.*, 2017). As regiões de profago também são reconhecidos por codificar importantes fatores de virulência e assim favorecer a adaptação e evolução bacteriana, assim como os demais elementos móveis (DURRANT *et al.*, 2020)

2.2.2. Tratamento das infecções causadas por *Citrobacter* e mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Para o tratamento de infecções causadas por espécies do gênero *Citrobacter* são utilizados antimicrobianos de diferentes classes, como a classe das sulfonamidas, primeiros agentes quimioterápicos eficazes utilizados para infecção bacteriana em humanos, são bacteriostáticos sintéticos derivados da sulfanilamida, que tem estrutura similar a do ácido para-aminobenzóico (PABA) que as bactérias necessitam para realizar a conversão em di-hidropteroato

necessário para a síntese de ácido fólico, purinas e conseqüentemente a síntese de ácidos nucléicos. Assim, as sulfonamidas atuam como antagonistas competitivos do PABA, incorporando-se aos precursores e formando um pseudometabólito que é reativo à bactéria. A combinação dessa classe com trimetoprim potencializa a sua atividade por agir na mesma via metabólica (QADIR; AHMED; IQBAL, 2015).

A classe dos betalactâmicos, também são utilizados para o tratamento de infecções causadas por espécies do gênero, se caracteriza pela presença de um anel β -lactâmico no centro da sua estrutura, apresentam um amplo espectro de atividade antibacteriana, sendo os antimicrobianos comerciais mais amplamente utilizados para tratar doenças infecciosas. Atuam ligando-se a proteína de ligação à penicilina (PBP) e inibindo as enzimas transpeptidases, componentes chave para a última etapa da biossíntese do peptidoglicano, responsável pela integridade da parede celular bacteriana, impedindo que as ligações cruzadas das fitas de peptidoglicano se formem e causando assim a lise e morte da bactéria devido a destruição da integridade da sua parede. Os betalactâmicos comuns incluem carbapenêmicos, penicilina, monobactâmicos e cefalosporinas (LINGZHI *et al.*, 2018).

Os carbapenêmicos, em especial, diferente dos demais representantes dessa classe apresentam ligado ao anel betalactâmico um anel carbapenêmico caracterizado como uma cadeia pentacíclica não-saturada ligada a um átomo de carbono, além de apresentar no lugar da cadeia acilamina, presente nas penicilinas, uma cadeia hidroxietila. Apesar das diferenças estruturais, os carbapenêmicos também atuam ligando-se a proteína de ligação à penicilina, inibindo a formação de peptidoglicano e conseqüentemente a parede celular bacteriana (PAPP-WALLACE *et al.*, 2011)

Os aminoglicosídeos, por sua vez, são utilizados no tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos, devido à sua atividade bactericida rápida e de amplo espectro. São antimicrobianos naturais e semi-sintéticos, que atuam ligando-se irreversivelmente a subunidade ribossomal 30 S, impedindo assim a tradução e síntese proteica bacteriana. A combinação dessa classe com betalactâmicos ou outras classes antimicrobianas que atuem como inibidores da parede celular aumenta a sua atividade. Os aminoglicosídeos inclui pelo menos oito drogas: amicacina, gentamicina, canamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, estreptomicina e tobramicina (PITIRIGA; DIMITROULIA; SAROGLU, 2017).

A classe dos anfenicóis é composta por antimicrobianos geralmente bacteriostáticos de amplo espectro de atividade, atuam ligando-se à subunidade ribossomal bacteriana 50S e bloqueia as funções ribossômicas fundamentais como a peptidiltransferase (PTase), a ligação e o movimento dos substratos ribossomais através do centro de PTase e o término da tradução,

podendo causar também imprecisão translacional *in vivo* (SAMSONOVA; CANNAVAN; ELLIOTT, 2012).

Os macrolídeos caracterizam-se pela presença de uma lactona macrocíclica de origem policetídica em sua estrutura com diferentes tamanhos de anel que vão de 12 a 16 membros, ligada a um açúcar e um amino-açúcar. Essa classe atua por meio da sua alta afinidade pelos ribossomos bacterianos, ligando-se à subunidade ribossomal 50S e interferindo a síntese proteica. São ativos principalmente contra bactérias Gram-positivas, mas apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas (DINOS *et al.*, 2017).

Os antimicrobianos da classe das tetraciclina são bacteriostáticos com amplo espectro de atividade, descobertos na década de 1940 e bem estabelecidos no mercado. Entram nas células por difusão passiva ou por um sistema de transporte ativo, que é provavelmente mediado de um modo dependente do pH, no interior das células atuam inibindo a síntese proteica ligando-se reversivelmente as subunidades ribossomais bacterianos 30S, 50S. Acredita-se que por ter uma afinidade estimada relativamente baixa ao ribossomo, as tetraciclina atuam também inibindo a função do fator essencial de prolongamento da GTPase bacteriana (GZYL; WIEDEN, 2017).

As quinolonas formam um grupo de antibióticos sintético com atividade contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, espécies de *Enterobacter*, espécies de *Salmonella e Shigella*, *Campylobacter e Pseudomonas aeruginosa*, porém as outras *Pseudomonas* são mais resistentes às quinolonas. O grupo inclui os agentes de amplo espectro ciprofloxacina, levofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, acrosoxacina e pefloxacina, bem como os fármacos de menor espectro utilizados nas infecções do trato urinário, a cinoxacina e o ácido nalidíxico (DOUROS; GRABOWSKI; STAHLMANN, 2014).

Estruturalmente similar às tetraciclina, a tigeciclina, primeiro membro da classe das glicilciclina, atua contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com exceção de *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus spp*, causando infecções complicadas na pele e tecidos moles, pneumonia adquirida na comunidade, além de infecções na região intra-abdominal causadas principalmente por *C. freundii*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. O sítio de ação desse antimicrobiano é a subunidade ribossomal 30S, onde se liga e impede o processo de tradução proteica (NI *et al.*, 2015).

Cloranfenicol é uma classe de antimicrobianos de amplo espectro, eficaz contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e riquetsias. Foi extraído em 1947 do microrganismo do solo *Streptomyces venezuelae*, é um bacteriostático que inibe a síntese proteica por se ligar a subunidade 50S do ribossomo bacteriano, porém, pode se apresentar como bactericida para

espécies como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *N. meningitidis* por meio de mecanismos não bem elucidados (ASPENSTRÖM-FAGERLUND *et al.*, 2016).

Os nitrofuranos são antibióticos sintéticos de amplo espectro que apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, alguns fungos e protozoários atuando em seu DNA, inibindo reversivelmente as enzimas de desaminação do piruvato. Os principais representantes dessa classe são: furaltadona, furazolidona, nitrofurantoína e nitrofurazona (ZANG *et al.*, 2016). A fosfomicina, por sua vez, é um bactericida de amplo espectro que atua a nível de parede celular bacteriana mais especificamente interferindo a biossíntese da parede ao inibir a formação do ácido N-acetilmurâmico precursor do peptidoglicano de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (FALAGAS *et al.*, 2016).

Em contrapartida dos antimicrobianos disponíveis para a terapia de infecções causadas por esses microrganismos, a resistência aos antimicrobianos se apresenta como uma importante barreira para o sucesso terapêutico, configurando um grave problema de saúde pública de proporção mundial, uma vez que esses mecanismos tem acompanhado a introdução das drogas no mercado, sendo detectada, muitas vezes, pouco tempo após o início de sua utilização em larga escala, como um reflexo do processo de evolução e adaptação constante em que as bactérias vivem. A situação atual caminha para o que foi vivenciado na “era pré-antibiótica” uma vez que o surgimento de novos recursos terapêuticos não acompanha a evolução dos mecanismos de resistência bacteriana. Na Figura 2 é possível observar em uma linha do tempo a rápida adaptação bacteriana e detecção de mecanismos de resistência logo após a introdução de um novo antimicrobiano no mercado (IREDELL, 2015).

A resistência pode se estabelecer por meio de mecanismos bacterianos como: produção de enzimas que degradam ou inativam os antimicrobianos; alteração da permeabilidade da membrana que impede ou dificulta a penetração do fármaco na célula; bombas de efluxo alteração do sítio alvo da droga. Tais mecanismos resultam, ou resultaram de mecanismos evolutivos como mutações em genes que alteram seus fenótipos e podem passar então a conferir resistência, esses genes podem ainda serem disseminados por transmissão vertical e horizontal de genes entre as bactérias (SCHWARZ; LOEFFLER; KADLEC, 2017; NURI; SHPRUNG; SHAI, 2015).

Espécies da Família Enterobacteriaceae vêm se tornando um grande desafio para a prática clínica devido à emergência e disseminação de linhagens bacterianas resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos, denominadas MDR (do inglês, *Multidrug-resistant*) (ABBOUD *et al.*, 2016).

Espécies do gênero *Citrobacter* como *C. freundii* e *C. koseri* apresentam resistência intrínseca a amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, ampicilina, ampicilina-sulbactam, cefalosporinas de primeira e segunda geração, cefamicinas, piperacilina e ticarcilina. Também

podem apresentar mecanismos de resistência adquiridos a esses e outros betalactâmicos, por meio da aquisição de genes que codificam uma das enzimas betalactamases pertencentes às quatro classes moleculares A, B, C e D, de acordo com a classificação de Ambler (LINGZHI *et al.*, 2018).

A betalactamase da classe A, TEM, descrita em *E. coli* na Grécia no início da década de 60, foi a primeira betalactamase mediada por genes plasmidiais em bactérias Gram-negativas, que atua hidrolisando ampicilina, assim como o outro tipo prevalente de betalactamase, a SHV-1 (LINGZHI *et al.*, 2018; EHMAN *et al.*, 2017). No entanto, com a pressão seletiva e o uso indiscriminado de betalactâmicos de amplo espectro utilizados para bactérias produtoras de betalactamases, as mutações nos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{TEM-1} e *bla*_{SHV}, que codificam as betalactamases de espectro restrito TEM, TEM-1 e SHV, passaram a conferir um espectro de hidrólise estendido, codificando novas enzimas denominadas betalactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês, *Extended Spectrum Beta-Lactamase*) (EHMAN *et al.*, 2017).

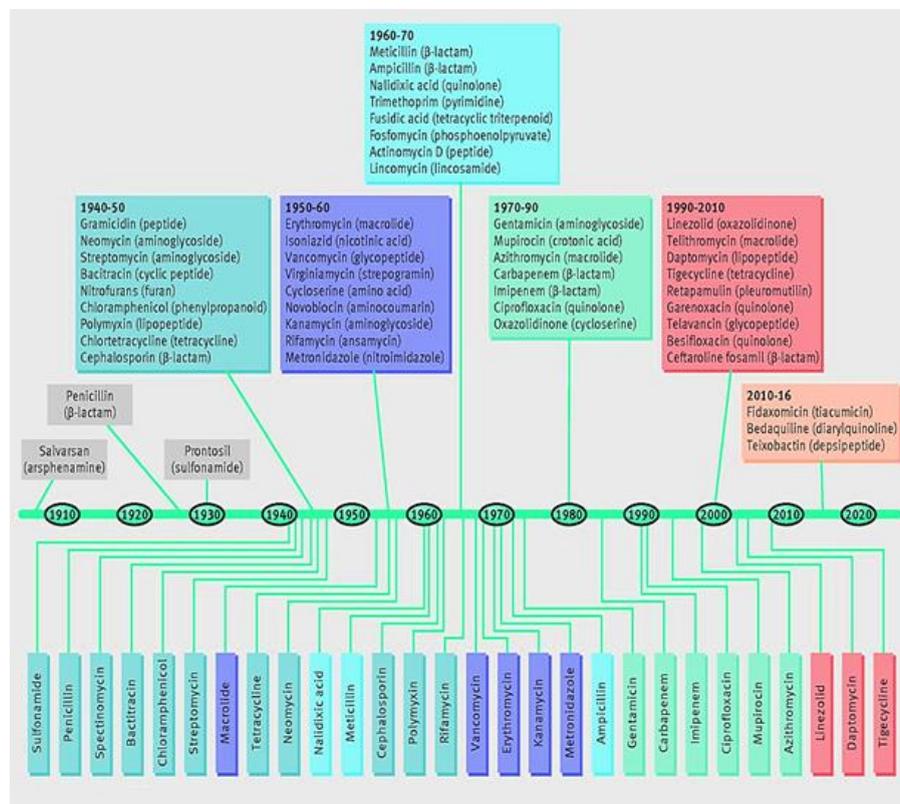
As ESBLs dos tipos TEM e SHV prevaleceram até o fim dos anos 90, mas durante os anos 2000, as enzimas do tipo CTX-M, conhecidas como cefotaximases por sua maior atividade hidrolítica contra cefotaxima, tornaram-se predominantes (EHMAN *et al.*, 2017). Geralmente, as ESBLs são inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam e são inertes contra carbapenêmicos e cefamicina. Porém, betalactamases como a cefalosporinase AmpC confere resistência à combinação de cefalotina, cefazolina, cefoxitina, maioria das penicilinas e também inibidores da betalactamase (D'ANGELO *et al.*, 2016).

As carbapenemases, também encontradas em *Citrobacter spp.*, são betalactamases codificadas por genes que podem estar em elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, e conferem resistência aos agentes carbapenêmicos, normalmente são encontradas em isolados bacterianos que já são resistentes a quase todos os outros antimicrobianos. São divididas em duas famílias: As serina-betalactamases e as metaloenzimas zinco dependentes (metalobetalactamases, MBLs), e, apesar das diferenças moleculares, ambas inativam os carbapenêmicos e demais antimicrobianos betalactâmicos, com exceção de aztreonam pelas metalobetalactamases. As carbapenemases mais comuns em isolados de Enterobacteriaceae são as enzimas *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) (PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS *et al.*, 2019; ROMNEY; HUMPHRIES, 2019).

A resistência aos aminoglicosídeos, por sua vez, pode ocorrer por meio de diversos mecanismos que podem coexistir na mesma bactéria. O mecanismo mais comum em isolados clínicos é a produção de enzimas modificadoras do antimicrobiano, como acetiltransferases (AACs), fosfotransferases (APHs) e nucleotidiltransferases (ANTs). Estas enzimas modificam a hidroxila ou grupos amino da 2-desoxistreptamina ou as porções de açúcar impedindo a ligação

ribossômica. Os genes codificadores dessas enzimas são frequentemente encontrados em elementos móveis (DUIJKEREN *et al.*, 2019).

Figura 2: Linha do tempo da evolução da resistência bacteriana frente a inovação terapêutica



Fonte: DAS *et al.* (2016).

Legenda: Na parte superior da linha do tempo, os antibacterianos introduzidos. Na parte inferior da imagem o desenvolvimento de resistência.

Outros mecanismos de aquisição de resistência incluem as alterações na permeabilidade pela modificação da membrana externa ou diminuição de transporte da membrana interna, aumento do efluxo e alterações no sítio de ligação da droga no ribossomo bacteriano codificadas por mutações nucleotídicas no rRNA 16S e modificações pós-transcricionais como a metilação da posição N-7 do nucleotídeo G1405 ou a posição N-1 do nucleotídeo A1408 no rRNA 16S por vários 16S metiltransferases de rRNA (16S-RMTases) (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016). A aquisição da resistência às quinolonas pode estar associada com três tipos de mecanismos: mutações cromossômicas que alteram o alvo e sua afinidade de ligação à droga; mutações cromossômicas levam à redução do acúmulo do antimicrobiano por diminuição da captação ou aumento do efluxo e a aquisição de plasmídeos contendo genes de resistência. O mecanismo mais comum de resistência de alto nível é devido a mutações no QRDRs (do inglês, *Quinolone*

Resistance Determining Regions) de pelo menos um dos genes que codificam os alvos primários e secundários das quinolonas, as DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) e as topoisomerasas IV (*parC* e *parE*) resultando em substituições de aminoácidos modificações estruturais do alvo desses antimicrobianos (CORREIA *et al.*, 2017).

Os genes plasmidiais *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* e *qnrVC*) e *aac* (6')-*Ib-cr* também conferem resistência às quinolonas, sendo os genes *qnr* responsáveis por codificar proteínas pentapeptídeos que protegem a girase de DNA e a topoisomerase IV da inibição da quinolona; o segundo codifica uma acetiltransferase de aminoglicosídeo que promove a resistência à ciprofloxacina por N-acetilação de sua piperazinil amina. A resistência a essa classe de antimicrobiano pode se dar ainda por meio de plasmídeos carregando os genes *qepAB* e *oqxAB* que codificam bombas de efluxo, promovendo assim um efluxo das quinolonas (JACOBY; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2014).

Da mesma forma que em outras espécies da Família Enterobacteriaceae, a resistência aos antimicrobianos por espécies do gênero *Citrobacter* aumentaram consideravelmente nos últimos anos, resultando no agravamento do prognóstico e aumentando o tempo de permanência do paciente no hospital. Entre as espécies *C. freundii* e *C. koseri*, o isolamento de cepas resistentes aos betalactâmicos, às quinolonas e aos aminoglicosídeos tem sido frequente dentro dos serviços de saúde (MAJEWSKI *et al.*, 2017). Particularmente as cepas da espécie de *C. freundii* protagonizam quadros de resistência a todos os betalactâmicos, bem como aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclina, tigeciclina e nitrofurantoína, (ZHANG *et al.*, 2008). Este perfil de resistência a múltiplos fármacos tem sido associado a uma maior taxa de mortalidade em pacientes hospitalizados em comparação a cepas suscetíveis (OLIVEIRA *et al.*, 2016). A presença do gene *mcr-1*, que confere resistência às polimixinas, foi detectada em um isolado de *Citrobacter freundii*, além de genes de resistência a múltiplas classes de antimicrobianos, indicando a espécie como um possível reservatório de genes de resistência e emergente problema de saúde (WANG *et al.*, 2018).

2.3 Classe das polimixinas

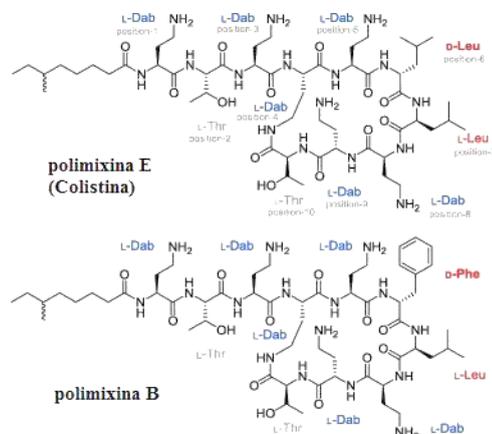
As polimixinas foram descobertas em 1947, tendo seu uso clínico disponível no final da década de 1950 e início da década de 1960 para o tratamento de bacilos Gram-negativos. Após vários anos de uso a sua utilização foi então suspensa devido aos relatos de efeitos colaterais indesejados, como nefrotoxicidade e neurotoxicidade, e especialmente com o surgimento de outros antimicrobianos (como os aminoglicosídeos) menos tóxicos. Isoladas a partir da cultura do bacilo

Gram-positivo *Bacillus polymyxa*, as polimixinas são caracterizadas como polipeptídios catiônicos, divididos em grupos denominados de polimixina A, B, C, D e E, sendo usado clinicamente apenas a polimixina B e E (colistina) devido à elevada toxicidade das demais (FALAGAS *et al.*, 2006).

As polimixinas são compostas pelo ácido 6-metil-octânico ou 6-metil-eptanoico e aminoácidos, apresentando ainda um lipídeo ligado à cadeia de peptídeo, sua base estrutural é um heptapeptídeo cíclico com uma cadeia lateral tripeptídica acilada por um ácido graxo no terminal amino (Figura 3). Este grupo antibiótico é considerado anfipático e distribui-se bem em substâncias aquosas e não aquosas. A composição química de cada membro do grupo das polimixinas depende da inserção de grupos amino livres nas posições 3 da cadeia linear, e das posições 6,7 e 10 da cadeia cíclica. As polimixinas de uso clínico compartilham sequência com diferença principal presente na posição 6 onde D-fenilalanina (D-Phe) em polimixina B é substituída por D-leucina (D-Leu) em polimixina E (colistina) (Figura 3) (FALAGAS *et al.*, 2006).

Estes antimicrobianos são classificados como bactericidas que atuam contra várias bactérias Gram-negativas devido ao seu efeito físico-químico, onde o anel peptídico policatiônico das polimixinas interagem de maneira eletrostática com o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, mais especificamente, com os grupos hidrofóbicos da porção do lipídeo A do LPS, que apresentam uma natureza aniônica; e também com as moléculas de fosfolipídeos na membrana externa, atuando como detergentes catiônicos substituindo as pontes de cálcio e magnésio que estabilizam o LPS. Essa intercalação das moléculas do antibiótico na membrana bacteriana provoca sua desorganização, extravasamento dos componentes celulares e conseqüente morte da célula (Figura 4) (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

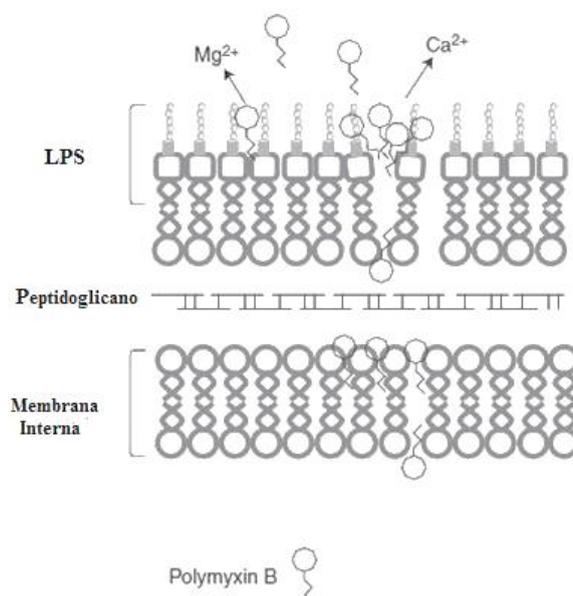
Figura 3: Estrutura química das polimixinas B e E (colistina).



Fonte: Jerke; Lee; Humphries (2016).

Nota: Polimixina E (colistina) apresenta, na posição 6, uma D-leucina (D-Leu), enquanto a posição 6 de polimixina B apresenta uma D-fenilalanina (D-Phe).

Figura 4: Interação dos polipeptídeos da polimixina com as membranas bacterianas.



Fonte: Costa (2017), apud Trimble *et al.* (2016).

As polimixina B e polimixina E apresentam um espectro de atividade semelhante, atuando de maneira efetiva contra a maioria dos bacilos Gram-negativos, em especial os membros da Família Enterobacteriaceae e espécies não fermentadoras de açúcares, mas não possuem atividade contra a espécies *Providencia spp.* e *Serratia spp.*, assim como bactérias Gram-positivas, fungos anaeróbicos. Entre os membros da Família Enterobacteriaceae, as espécies *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *E.coli*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*, são frequentemente susceptíveis, assim como *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas. aeruginosa* são ambos naturalmente susceptíveis à polimixina B e E (TRIMBLE *et al.*, 2016; NIKOO; MARDANEH, 2017).

Devido à atividade antibacteriana das polimixinas não depender diretamente da atividade metabólica da bactéria, o desenvolvimento de resistência a essa classe de antimicrobianos é considerado ainda raro. No entanto, diante da dependência cada vez maior do uso de polimixinas como última opção terapêutica para o tratamento de infecções bacterianas causadas por bacilos Gram-negativos resistentes a múltiplos antimicrobianos, os relatos de desenvolvimento de resistência às polimixinas têm sido crescente, assim como o seu uso (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

2.3.1 Mecanismos de resistências às polimixinas

A resistência dos microrganismos às polimixinas não está completamente elucidada, porém sabe-se que ocorre por mecanismos de mutação ou adaptação. No geral, a resistência às polimixinas surge a partir de modificações no alvo da droga, ou seja, o LPS bacteriano. Tais modificações se referem a substituições nos grupos hidrofóbicos do LPS, como a dos grupos fosfato do lipídeo A, que garantem a natureza aniônica da membrana, por açúcares ou por radicais de natureza catiônica, como a fosfoetanolamina (PEtN) ou 4-amino-4-desoxiL-arabinose (L-Ara4N), resultando em uma repulsão eletrostática, impedindo que ocorra a interação que ocorreria entre as moléculas das polimixinas de natureza catiônica com o LPS de, até então, natureza aniônico (WRIGHT *et al.*, 2015; CRUZ-MACHADO, 2010).

A adição de PEtN e L-Ara4N na porção do lipídeo A ocorre por meio das enzimas reguladas por sistemas cromossomais de adaptação bacteriana que respondem a condições ambientais e de cultivo, como baixo pH, baixa concentração de Fe^{+3} e Mg^{+2} , ou ainda a presença de peptídeos antimicrobianos. Conhecidos como “*two-component systems*” (TCSs) ou sistema de regulação da expressão gênica de dois componentes, são constituídos por uma proteína transmembrana, o sensor de histidina quinase, responsável por captar os estímulos ambientais citados com o seu domínio sensor, o estímulo é propagado através do domínio HAMP para a histidina quinase e ativar o sistema através do seu domínio transmissor que sofre autofosforilação dependente de ATP, esse resíduo de histidina fosfatada doa um fosfato inorgânico por meio de uma reação de autofosforilação para o domínio receptor da segunda proteína componente do sistema, a proteína reguladora de resposta, localizada na região citoplasmática da bactéria (WRIGHT *et al.*, 2015; CRUZ-MACHADO, 2010).

O fosfato doado é recebido por um resíduo conservado de aspartato da proteína reguladora de resposta que quando fosforilada sofre modificação no seu domínio de saída, por se tratar de um domínio do tipo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA direciona a transcrição dos genes alvos, necessários para uma resposta adequada ao estímulo inicial, inclusive a transcrição dos que codificam as substituições nos grupos fosfatos do lipídeo A. A ativação desse sistema é um mecanismo de adaptação que pode ser “desligado”, no entanto, mutações nos genes que codificam esses sistemas podem implicar em modificações no perfil de virulência da bactéria e na ativação constitutiva do sistema, levando a modificação permanente do LPS e a resistência adquirida às polimixinas independente das condições ambientais ou de cultivo (WRIGHT *et al.*, 2015).

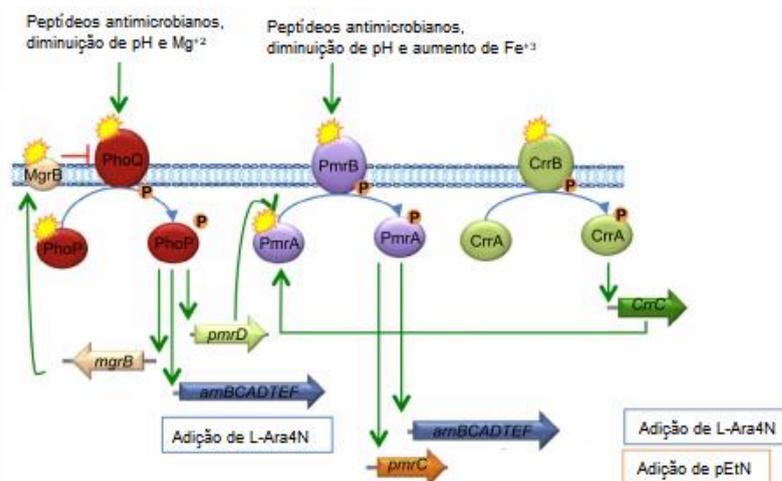
Entre os sistemas TCS de regulação da expressão gênica os sistemas PhoPQ e PmrAB regulam a expressão do gene *pmrC* que promove a adição de fosfoetanolamina (PEtN) no lipídeo A e dos genes do operon *pmrHFIJKLM*, também denominado *arnBCADTEF*, que codificam as enzimas para a biossíntese e a transferência de 4-amino-4-desoxiL-arabinose (L-Ara4N) ao lípido A em resposta a presença de peptídeos antimicrobianos de natureza catiônica como as polimixinas. Outros componentes regulatórios nesta via incluem as proteínas conectoras PmrD e MgrB, que transmitem *feedback* entre o PmrAB e PhoPQ e regulam a expressão desses sistemas (CHENG *et al.*, 2016).

O sistema CrrAB é o TCS recentemente descrito como associado ao desenvolvimento de resistência às polimixinas em *K. pneumoniae*, além de influenciar na expressão da virulência das bactérias devido as modificações no LPS por meio da regulação de genes adjacentes que codificam uma glicosiltransferase do tipo TupA; ou ainda por uma possível proteína transportadora, a CrrC, que promove uma interação (direta ou indireta) com o sistema PmrAB, onde o sensor de histidina quinase desse TCS, CrrB, fosforila, por meio de CrrC, a proteína reguladora PmrA, modulando assim a expressão de *pmrHFIJKLM* (*arnBCADTEF*) e *pmrC* como é possível observar na figura 5 (CHENG *et al.*, 2016).

Tais modificações podem levar a uma resistência adaptativa às polimixinas, no entanto, muitas mutações têm sido identificadas como potenciais indutores da resistência constitutiva às polimixinas, entre essas, a mutação ou truncamento do gene *mgrB* já foi descrita como fonte da resistência em *K. pneumoniae* (POIREL *et al.*, 2014), assim como mutações em *pmrAB* e *phoPQ* (JAYOL *et al.*, 2017). Em CrrAB, trocas de aminoácidos principalmente pontais nos domínios transmembranar, histina quinase e HAMP, que atua como um transmissor de sinal entre o domínio sensor e a histidina quinase da proteína CrrB, são associados ao desenvolvimento de resistência às polimixinas (JAYOL *et al.*, 2017).

Relatórios recentes afirmam que várias ISs podem integrar em genes cromossômicos, levando ao aumento de antibióticos resistência à colistina em *K. pneumoniae*. Os elementos IS, ISKpn26, ISEcp1, IS10R, IS903B ou ISKpn14 foram identificados em *mgrB* e na região circundante de *crrCAB* associados a resistência à colistina em *K. pneumoniae*, no estudo de Yang e colaboradores em 2020, onde a frequência de resistência à colistina aumentaram significativamente em indivíduos suscetíveis a colistina com plasmídeos carregando diferentes ISs de cepas clínicas.

Figura 5: Funcionamento e Interação dos TCSs.



Fonte: Jeannot, Borlad e Plésiat (2017).

Legenda: *arnBCADTEF*: *pmrHFIJKLM*; P: Fosfato inorgânico.

Nota: Setas em verde indicam regulação positiva entre os componentes; Seta em vermelho indica regulação negativa entre os componentes; Setas em azul indicam o percurso do fosfato entre os componentes.

As bombas de efluxo transportadores de múltiplas drogas também já foram reconhecidas como mecanismos importantes de resistência às polimixinas. A proteína CrrB mutada pode mediar de forma adicional a resistência às polimixinas via bomba de efluxo do tipo o RND co-transcrita com *crrC* (CHENG *et al.*, 2018). Sun e colaboradores (2020) identificaram uma bomba de efluxo de múltiplas drogas KexD com transcrição elevada induzidas por *crrB* mutado contribuindo para a resistência à polimixina em *K. pneumoniae* (SUN *et al.*, 2020).

Além dessas vias de aquisição de resistência às polimixinas, no final de 2015, uma fosfoetanolamina transferase foi descrita codificada pelo gene plasmidial *mcr-1* (*mobile colistina resistance*) em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* de origem animal e humana na China, como o primeiro gene de resistência à polimixina mediado por plasmídeo (CANIAUX *et al.*, 2017).

Os genes *mcr*, são oito tipos descritos, estão associados a adição de fosfoetanolamina ao lipídeo A de forma semelhante as mutações cromossômicas, resultando na redução de afinidade eletrostática da polimixina com a estrutura do LPS. No entanto, os isolados portadores do gene podem apresentar baixo nível de resistência às polimixinas, e em alguns casos os isolados podem ser suscetíveis à essa classe de antibacterianos, o que pode contribuir para a disseminação silenciosa do gene entre isolados e indica a existências de outros fatores associados ao fenótipo de resistência em BGNs (DALMOLIN *et al.*, 2018).

Após sua descoberta, isolados carregando *mcr*, principalmente *mcr-1* e menos comumente *mcr-2* a 7, foram relatados na Ásia, África, Europa, América do Norte, América do Sul e Oceania, em isolados de várias espécies de bactérias Gram-negativas como *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella entérica*, *Cronobacter sakazakii*, *Kluyvera ascorbata*, *Shigella sonnei*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter braakii*, *Raoultella ornithinolytica*, *Proteus mirabilis*, *Aeromonas*, espécies de *Moraxella* e *Enterobacter* de origem animal, produtos alimentícios, meio ambiente e humanos (NANG; LI; VELKOV, 2019).

2.4 Filogenia do sistema CrrAB

De acordo com estudos de análises genômicas comparativas, o sistema CrrAB não é ortólogo de outros TCS ligados a PhoPQ ou de resposta ao estresse celular, como RcsAB, RstAB, EvgAS, CpxAR e BaeSR. É encontrado na maioria dos genomas de *K. pneumoniae* e em outras espécies de Enterobacteriaceae de forma variável como em *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii* e *Shigella flexneri* (Cheng *et al.*, 2018), estando as espécies do gênero *Citrobacter* entre essas.

Em *E. coli* e *Salmonella*, *crrAB* não tem ortólogos bem elucidados. O locus *crrAB* se apresenta nessas cepas em contextos genômicos distintos, com uma variação significativa do conteúdo GC em relação ao conteúdo GC do genoma e em algumas cepas com IS's remodelando a região do locus, sugerindo assim, uma aquisição lateral desses genes e, portanto, que essa região não é essencial para o crescimento bacteriano (WRIGHT *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2018).

Adjacente aos genes *crrAB*, estão presentes na maioria dos genomas positivo para o sistema, um gene que codifica uma proteína de membrana hipotética conservada e um gene que codifica uma glicosiltransferase. O *crrC*, está presente em uma região proximal a *crrAB* e também é regulado por *crrB*, codificando uma possível proteína transportadora e seus homólogos foram identificados em diferentes bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola*, *Enterobacter cloacae* e *Shigella flexneri*) de forma variável e compartilhando pelo menos 45% de identidade de sequências de aminoácidos (CHENG *et al.*, 2016).

Cepas de *K. pneumoniae* sem os genes *crrAB* apresentam em sua localização uma lipoproteína de função desconhecida, uma integrase e uma transposase relacionadas a fago, pouco se tem descrito sobre a distribuição desse locus nos genomas de *Citrobacter* e em qual contexto está inserido quando presentes, levando em consideração a variabilidade da aquisição lateral dos genes *crrAB* (WRIGHT *et al.*, 2015).

2.5 Modelos de infecção *in vivo*

Os modelos de infecção *in vivo* nos permitem, sobre tudo, o estudo da interação entre o hospedeiro e o patógeno de forma que elucide os mecanismos de patogenicidade durante a infecção e a possível resposta do hospedeiro, mimetizando, da forma mais próxima possível, a infecção e seus mecanismos assim como ocorreria no organismo de animais e humanos, o que não é possível ser observado em estudos *in vitro*. São considerados bons modelos aqueles que permitem reproduzir tal característica ou doença de interesse, possibilitando investigar os mecanismos fisiológicos e patológicos envolvidos, os sintomas desencadeados, o avanço da terapêutica e toxicidade (ANDERSEN; WINTER, 2017).

Embora muitos modelos apresentem uma fisiologia semelhante e respondam a patologia e terapêutica também de maneira similar aos animais e humanos, existem diferenças significativas entre espécies de animais modelos, o que requer a escolha de um modelo que possa responder o que se quer estudar e reproduza o curso que a doença ou quadro infeccioso realiza nos organismo (ANDERSEN; WINTER, 2017).

O sistema biológico mais utilizado para modelar infecções bacterianas *in vivo* é o modelo murino, por apresentar semelhanças significativas com o sistema imunológico de humanos, possibilitando assim, entre outros aspectos, o estudo de infecções em diferentes sítios e por diferentes espécies bacterianas, o estudo de novos alvos de drogas e/ou a eficácia dessa possível terapêutica, pesquisas acerca das respostas imunes inata e adquirida do hospedeiro frente à infecção, assim como a avaliação da virulência do patógeno bacteriano (ANDERSEN; WINTER, 2017).

No entanto, às questões éticas ligadas ao uso de animais mamíferos e de grande porte na pesquisa científica, as dificuldades orçamentárias e logísticas do uso de modelos murinos para o estudo de infecções bacterianas fez com que o uso de modelos animais alternativos não-mamíferos fosse introduzido para essa finalidade, por apresentarem vantagens como a liberação de questões éticas, o melhor custo-benefício, a fácil manutenção, curto ciclo de vida e a produção de um grande número de animais capazes de produzir números estatísticos consideráveis para o resultado dos ensaios, além das semelhanças imunológicas com os mamíferos, que em certos aspectos, se mantêm conservadas entre as espécies (O'CALLAGHAN; VERGUNST, 2010).

Entre os modelos alternativos disponíveis, o nematódeo *Caenorhabditis elegans* foi o primeiro modelo a se destacar devido sua capacidade natural de se alimentar de bactérias, o que

permitiu o desenvolvimento de metodologias voltadas para o estudo da virulência bacteriana por meio da análise de sobrevivência após a utilização, muitas vezes, da bactéria de interesse como fonte alimentar do modelo, iniciando a infecção no intestino onde as células epiteliais, que forma a primeira defesa imune inata, são bastante semelhantes em morfologia, estrutura e função com as células epiteliais humanas. O modelo de *C. elegans* apresentam ainda vantagens como tratabilidade genética, cultura barata, tempo de geração curto, corpo transparente que permite a visualizadas de patógenos marcados, danos teciduais e suscetibilidade a uma gama de patógenos bacterianos e fúngicos (EVERMAN *et al.*, 2015).

Insetos do gênero *Drosophila*, por sua vez, são utilizados em ensaio de infecção para o estudo de virulência e patogenicidade bacteriana devido as semelhanças funcionais com o sistema imunológico inato de mamíferos, como as barreiras físicas formadas por epitélios e respostas imune local e sistêmica por meio da produção de peptídeos antimicrobianos, espécies reativas de oxigênio e os hemócitos que atuam como fagócitos especializados. O ensaio de infecção com esse modelo pode ser realizado por meio de dois métodos: a picadura na região do tórax com agulha com a suspensão bacteriana e via oral com a solução bacteriana misturada na alimentação. A sobrevivência dos animais em estudo pode ser observada de 2 a 3 dias no primeiro método e até 2 semanas no segundo (MULCAHY *et al.*, 2011).

Outro exemplo de modelo animal alternativo para infecção *in vivo* são embriões de peixe zebra que até a quarta semana após a fertilização apresentam um sistema imune inato semelhante ao dos mamíferos, enquanto o sistema imunológico adaptativo não está totalmente funcional impedindo assim interferências adaptativas na resposta imunológica. A transparência na fase embrionária permite ainda visualizar a instalação do quadro infeccioso em tempo real. Originalmente esse modelo, especialmente o peixe adulto, era usado para o estudo da virulência e patogenicidade de micobactérias, mas, atualmente, a sua utilização se expandiu para um grande número de bactérias (O'CALLAGHAN; VERGUNST, 2010). Especialmente as larvas desse inseto têm sido amplamente utilizadas como modelo animal alternativo para infecções bacterianas e fúngicas.

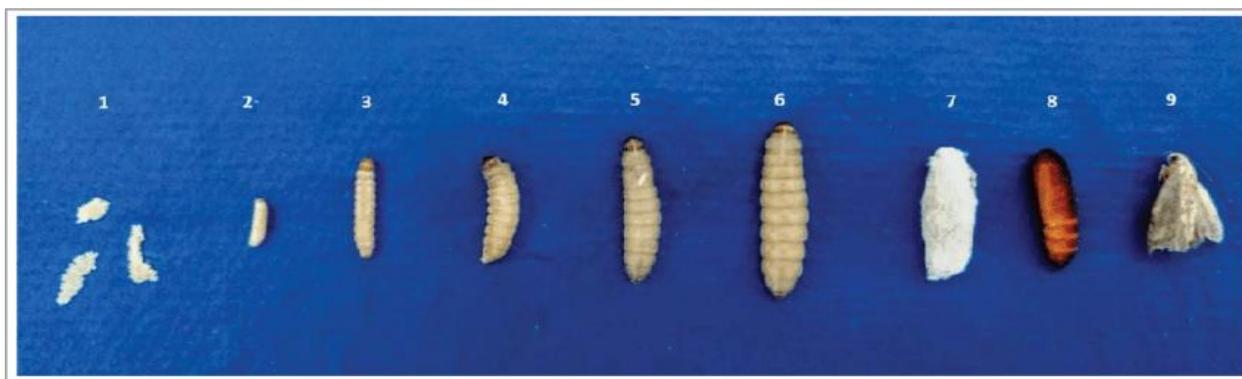
2.5.1 Modelo de infecção *Galleria mellonella*

A *Galleria mellonella* é uma espécie de inseto pertencente a ordem *Lepidópteros* e a família *Pyralidae*, sendo a única espécie representante do gênero *Galleria*. Conhecida popularmente como a 'traça grande da cera' ou 'traça do favo de mel' uma vez que, em condições naturais, habitam colmeias e se alimentam de cera de abelha, mel e pólen, sendo considerada uma

“praga” por poluírem as colmeias com fezes e propiciarem um ambiente ideal para o desenvolvimento de fungos. Seu ciclo de vida incluem as formas evolutivas de ovo, larva, pupa e mariposa (Figura 6) em um processo que dura aproximadamente de aproximadamente 7 a 8 semanas em uma temperatura entre 25-28 ° C, pois a temperatura, assim como em outras espécies, exerce uma influência sobre o desenvolvimento das fases imaturas desse inseto (PUBLICZNEGO *et al.*, 2018).

As formais larvais de *Galleria mellonella*, especialmente, têm sido amplamente utilizadas como modelos animais alternativos para o estudo de virulência e patogenicidade por apresentarem um sistema imunológico inato com notáveis semelhanças funcionais e estruturais com a resposta imune inata de mamíferos, incluindo resposta celular e humoral. Nesse paralelo podemos observar a presença de cutícula no inseto que funciona como barreira física, assim como a pele para os mamíferos, já a hemolinfa que é análogo ao sangue dos mamíferos contém células imunes chamadas de hemócitos que realizam fagocitose, nodulação e encapsulamento de patógenos, assim como a atividade desenvolvida pelas neutrófilos (WU *et al.*, 2017).

Figura 6: Formas evolutivas do inseto *Galleria mellonella*.



Fonte: Jorjão (2017).

Legenda: Ovos (1); Larvas (2,3,4,5 e 6); Pulpas (7 e 8) e Mariposa (9).

As formais larvais de *Galleria mellonella*, especialmente, têm sido amplamente utilizadas como modelos animais alternativos para o estudo de virulência e patogenicidade por apresentarem um sistema imunológico inato com notáveis semelhanças funcionais e estruturais com a resposta imune inata de mamíferos, incluindo resposta celular e humoral. Nesse paralelo podemos observar a presença de cutícula no inseto que funciona como barreira física, assim como a pele para os mamíferos, já a hemolinfa que é análogo ao sangue dos mamíferos contém células imunes chamadas de hemócitos que realizam fagocitose, nodulação e encapsulamento de patógenos, assim como a atividade desenvolvida pelas neutrófilos (WU *et al.*, 2017).

Os tipos mais comuns de hemócitos são pró-hemócitos, plasmatócitos, células granulares, células esféricas e enocitoides e suas concentrações variam de acordo com a espécie, desafio infeccioso e estágio de desenvolvimento. A resposta humoral, por sua vez, é modulada por proteínas do tipo complemento, melanina e peptídeos antimicrobianos. A resposta imunológica inata é de suma importância para a resposta às infecções e os insetos, como *G. mellonella*, devido às semelhanças, apresentam resultados com fortes correlações com os resultados obtidos em modelo murino (PEREIRA *et al.*, 2018).

Esse modelo alternativo apresenta ainda outras vantagens consideráveis como: Um ciclo de vida curto, com cultivo de baixo custo sem necessidade de instalações específicas para a sua criação, em uma faixa de temperatura que pode ir de 20 ° C a 37° C o que permite a realização de experimentos que imitem as condições de temperatura encontradas em mamíferos, alimentação a base de uma ração simples composta por cera de abelha e diferentes farelos (PEREIRA *et al.*, 2018).

As mariposas ovopõem cerca de 1500 ovos, o que garante a obtenção de um grande número de animais, a forma larval, por sua vez, atinge no seu último estágio um tamanho de aproximadamente 2 cm, adequado para o processamento do ensaio de infecção. *Galleria mellonella* é susceptível a um grande número de patógenos podendo responder a eles de maneira dose-dependente e visual por meio da melanização produzida pela resposta imunológica durante o quadro infeccioso e outros aspectos de morte bem característicos. A infecção das larvas permite ainda monitorar a virulência bacteriana por vários meios como o cálculo do LD₅₀ e a medição da sobrevivência bacteriana pela extração da hemolinfa (RAMARAO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012).

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

- Avaliar as bases genômicas e genéticas do sistema regulatório da expressão gênica CrrAB e sua possível influência no fenótipo de virulência de *Citrobacte freundii*.

6.2 Objetivos específicos

- Identificar a cepa de estudo, *Citrobacter* C156, em nível de espécie bacteriana e confirmar o seu perfil de suscetibilidade à polimixina;
- Estudar a distribuição do TCS CrrAB em genomas de Enterobacteriaceae's, assim como em genomas de *Citrobacter* e da espécie *Citrobacter freundii*;
- Avaliar o contexto genético em que o *locus crrAB* está inserido nos diferentes genomas e determinar a sua possível relação com o mobiloma da cepa *Citrobacter* C156;
- Avaliar a virulência e patogenicidade da cepa *Citrobacter* C156 em comparação com as cepas ATCC's 8090 e 43864 da espécie *Citrobacter freundii* em modelo *in vivo* de infecção em larva de *Galleria mellonella*;
- Identificar e comparar os fatores de virulência das cepas de estudo utilizadas no ensaio de infecção em larvas de *Galleria mellonella*.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

A cepa de estudo *Citrobacter* C156, de origem clínica, foi isolada de amostra de líquido pleural, apresentando resistência às polimixinas. Após sequenciamento do genoma (SAMN13908065) e estudos pós-genômicos nenhum gene plasmidial de resistência às polimixinas foi encontrado, no entanto, mutações nos genes *crrA* e *crrB* (*locus* GXB76_15895 e GXB76_15900) do TCS CrrAB foram identificadas, sendo a mutação pontual G271A do gene *crrB* deletéria a função da proteína codificada CrrB. As cepas *Citrobacter freundii* ATCC 8090 e ATCC 43864, susceptíveis às polimixinas, também foram utilizadas no estudo. Todos os isolados foram cultivados em meio sólido a 37 °C por 18-24h. As cepas bacterianas utilizadas no estudo estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Amostras bacterianas utilizadas neste estudo.

Cepas bacterianas	Descrição / Genótipo	Fonte ou referência
<i>Citrobacter freundii</i> C156	Amostra clínica de <i>Citrobacter freundii</i> resistente à colistina. Conteúdo GC de 51,58% e o tamanho do genoma total de 5.134.774 bases. Positiva para o TCS CrrAB, gene <i>crrB</i> com mutação deletéria pontual G271A.	Amostra clínica – Este estudo
<i>Citrobacter freundii</i> (L126)	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090 susceptível à colistina.	American Type Culture Collection
<i>Citrobacter freundii</i> (L129)	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864 susceptível à colistina.	American Type Culture Collection

7.2 Multilocus Phylogenetic Analysis

A identificação em espécie bacteriana da amostra de *Citrobacter* C156, realizada anteriormente por MALDI-TOF, foi confirmada pela análise filogenética pelo método de *Multilocus Phylogenetic Analysis* (MLPA) baseado nas sequências dos quatro genes *housekeeping* *rpoB*, *fusA*, *pyrG* e *leuS* da cepa *Citrobacter* spp. C156 e de 13 cepas tipo (^T) de espécies do gênero *Citrobacter*: *C. freundii* CIP 57.32^T, *C. amalonaticus* CIP 82.89^T, *C. braakii* CIP 104554^T, *C. farmeri* CIP 104553^T, *C. gillenii* CIP 106783^T, *C. koseri* CIP 82.87^T, *C. murlinae* CIP 104556^T, *C. rodentium* CIP 104675^T, *C. sedlakii* CIP 105037^T, *C. europaeus* CIP 106467^T, *C. werkmanii* CIP 104555^T, *C. pasteurii* CIP 55.13^T e *C. youngae* CIP 105016^T, disponíveis no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) foram concatenadas e utilizadas para gerar a árvore filogenética. A árvore foi determinada por método de *neighbor-joining* pelo software MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), baseado no modelo de substituição Jukes-Cantor, com o suporte de 1000 replicações de *bootstrap*, seguindo descrito por Clermont e colaboradores (CLERMONT *et al.*, 2015).

7.3 Teste de sensibilidade à polimixina B

Para confirmar o perfil de suscetibilidade da cepa *Citrobacter* C156 às polimixinas observado anteriormente, foi realizado o teste de sensibilidade por microdiluição em caldo seguindo protocolos pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2015). A amostra foi cultivada em ágar nutriente, de modo a obter colônias isoladas, e incubada por 18 – 24h a 35±2°C. Em seguida 3 a 5 colônias isoladas foram resuspendidas em microtubos estéreis contendo 1 mL de MHB, realizando ao todo 5 mL de suspensão bacteriana, e a densidade óptica da suspensão determinada a 625 nm (OD₆₂₅) utilizando uma diluição 1:10 da suspensão bacteriana (100 µL da suspensão + 900 µL de MHB), ajustada para OD₆₂₅ para 0,08 – 0,13 UA (ou OD₆₀₀ para 0,06 UA), correspondente a 0,5 da escada de McFarland (1 – 5 10⁸ UFC/mL).

Em seguida, a suspensão bacteriana ajustada para 1 – 5 x 10⁸ UFC/mL foi misturada em vortex, diluída **1:100** em MHB estéril (1 – 5 x 10⁶ UFC/mL) e inoculado 5mL de suspensão bacteriana em poços contendo 100 µL do agente antimicrobiano colistina diluído em série para produzir um inóculo final de aproximadamente 5 × 10⁴ CFU / mL. O CIM foi lido após incubação (18–24 h) a 35 ° C e interpretado de acordo com a distribuição do EUCAST. O controle de qualidade para CIMs foi realizado usando a referência *E. coli* ATCC 25922.

7.4 Sintenia genética do *locus* de *crrAB* em Enterobacteriaceae

A topologia do agrupamento da região *crrAB* e a sintenia do *locus* em espécies de Enterobacteriaceae foram avaliadas utilizando a ferramenta online SyntTax: <https://archaea.i2bc.paris-saclay.fr/SyntTax/Default.aspx>, que realiza sintaxe projetada a partir do cruzamento e comparação das sequências da região de interesse dos genomas de arqueas e bactérias, vinculando-os por meio de relações taxonômicas (OBERTO, 2013). Foi utilizada a sequência de CrrB para gerar o relatório no SyntTax com o intuito de analisar a composição genética da região *crrAB* em diferentes genomas. De forma complementar, foi realizada ainda a comparação do arranjo genético da região *crrAB* utilizando o aplicativo de visualização de comparação de genoma Easyfig, onde é possível visualizar as regiões correspondentes entre os genomas de acordo com a porcentagem de identidade de sequência prevista no BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

7.5 Filogenia de CrrAB e outros *Two Component Systems*

Para avaliar a do TCS CrrAB e de outras proteínas de sistemas reguladores de dois componentes envolvidas na modificação de superfície e/ou resistência à polimixina como PhoPQ, PmrAB, RcsAB, RstAB, EvgAS, CpxAR e BaeSR em Enterobacteriaceae, foi realizada uma análise filogenética das proteínas desses sensores de histidina quinase e regulador de respostas da cepa de estudo, *Citrobacter* C156, e de outros genomas públicos disponíveis de cepas de Enterobacteriaceae positivas para *crrAB*. Para gerar uma árvore de verossimilhança foi utilizada a ferramenta PhyML Maximum Likelihood do software Unipro UGENE v34.0 e a árvore visualizada no iTOL (<https://itol.embl.de/>). Para análise da conservação dessas proteínas nos diferentes genomas em que CrrAB está presente, foi feita uma análise comparativa da sequência de aminoácidos das proteínas CrrA e CrrB do sistema da cepa C156 com o de outros genomas públicos disponíveis de *C. freundii* positivos para o TCS CrrAB, as estirpes *K. pneumoniae* UHKPC45 e MGH78578 foram incluídas como referência e as ferramentas ClustalW e T-Coffee utilizadas para a análise.

7.6 Relação filogenética de cepas de *Citrobacter*

A relação genética das cepas de *Citrobacter* foi determinada por uma árvore de máxima verossimilhança construída pelo método CodonTree, utilizando o programa RAxML (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*) da ferramenta PATRIC (Pathosystems Resource Integration

Center): <https://www.patricbrc.org>, com base em genes de cópia única compartilhadas pelas 199 cepas do gênero *Citrobacter*, incluindo a cepa de estudo *Citrobacter* C156. Foi realizada ainda a estimativa de árvore não enraizada com 79 genomas apenas da espécie *Citrobacter freundii*, utilizando os mesmos parâmetros da árvore anterior com base em 494 genes de cópia única.

Uma terceira árvore foi estimada pelo método *Neighbor-joining* de acordo com o tipo de sequência MLST (ST, *sequence type*) definida a partir das sequências nucleotídicas concatenadas dos alelos dos genes *aspC*, *clpX*, *fadD*, *mdh*, *arcA*, *dnaG* e *lysP*, utilizando o software BIGSdb no banco de dados MLST (<https://pubmlst.org/cfreundii/>). As árvores filogenéticas foram visualizadas na ferramenta iTOL v.5 (<https://itol.embl.de/>).

7.5 Análise do mobiloma da cepa *Citrobacter* C156

A análise do mobiloma da cepa C156 foi realizada no servidor da web VRprofile, disponível online em: <https://db-mml.sjtu.edu.cn/STEP/index.php>, utilizando a ferramenta MobilomeDB que prever por homologia de similaridade da sequência de proteínas agrupamentos de genes, como de sistemas de secreção bacterianos do tipo III / IV / VI / VII e elementos genéticos móveis, incluindo elementos integrativos e conjugativos, profagos, integrons de classe I, elementos IS e elementos de patogenicidade / antibióticos ilhas de resistência. O perfil do conteúdo GC da região de interesse do genoma também foi realizado com essa ferramenta (LI *et al.*, 2018). De forma complementar, foi utilizada a ferramenta PHASTER (Phage Search Tool Enhanced Release), disponível online em: <https://phaster.ca/>, para rápida identificação e anotação de sequências de profagos no genoma da cepa C156, por meio de pesquisas BLAST em um banco de dados de profago / fago personalizado que combina sequências de proteínas do NCBI e do banco de dados de profagos desenvolvido por Srividhya *et al* (2006). Foi realizada ainda a pesquisa de plasmídeos utilizando a ferramenta PlasmidFinder (disponível em: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) que é baseada em um banco de dados curado de replicons de plasmídeo destinados à identificação de plasmídeos em sequências de genoma inteiro originadas de espécies de Enterobacteriaceae.

7.6 Modelos de infecção *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella*

As formais larvais de *Galleria mellonella*, especialmente, têm sido amplamente utilizadas como modelos animais alternativos para o estudo de virulência e patogenicidade por apresentarem

um sistema imunológico inato com notáveis semelhanças funcionais e estruturais com a resposta imune inata de mamíferos, incluindo resposta celular e humoral. A presença de cutícula no inseto funciona como barreira física, assim como a pele para os mamíferos, já a hemolinfa que é análogo ao sangue dos mamíferos contém células imunes chamadas de hemócitos que realizam fagocitose, nodulação e encapsulamento de patógenos, assim como a atividade desenvolvida pelas neutrófilos (WU *et al.*, 2017).

Para a utilização nos ensaios de infecção nesse estudo, as larvas do inseto *Galleria mellonella* foram mantidas em potes plásticos com as tampas perfuradas para a passagem de oxigênio e protegidas com uma tela de voal. A alimentação é composta por cera alveolada e uma ração a base de açúcar mascavo, glicerol, leite em pó, levedo de cerveja, farinha de trigo integral, farelo de trigo e gérmen de trigo. É utilizada também uma cartolina no fundo dos potes, durante a fase de mariposa, como matriz para ovoposição. As larvas são mantidas nesses microambientes em uma temperatura constante de 28 °C até o último estágio da fase larval com um peso corporal de aproximadamente de 0,280 a 0,320 g que é considerado ideal para a realização dos experimentos de infecção (JORJÃO *et al.*, 2018).

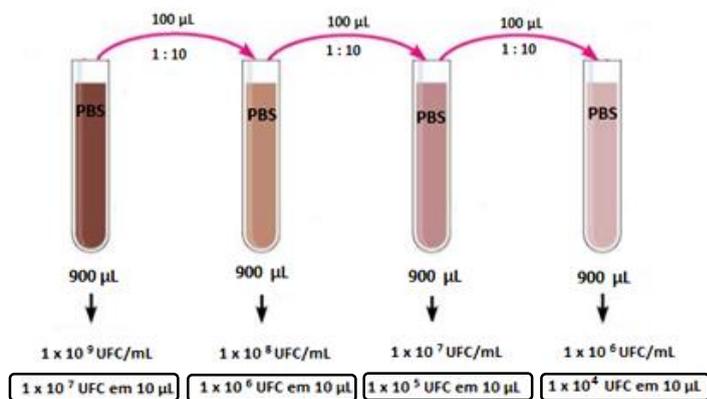
Para a preparação dos inóculos das cepas de estudo listadas na Tabela 1 utilizadas no ensaio de infecção, foi medida a absorbância de cada uma das culturas bacterianas, incubadas em LB líquido a 37 °C por 18-24h, a 600nm (DO₆₀₀) em uma diluição de 1:10 em solução de PBS (tampão fosfato-salino) estéril e apirogênico (100 µL da suspensão bacteriana em PBS e 900 µL do PBS) e ajustado para uma DO₆₀₀ de 1, que corresponde a aproximadamente 1 x 10⁹ UFC/mL (10⁷ UFCs). Em seguida, foi realizada diluições seriadas de 1:10 a partir da solução de concentração 1 x 10⁹ UFC/mL (10⁷ UFCs) até a concentração 1 x 10⁶ UFC/mL (10⁴ UFCs), obtendo, assim, as concentrações de 10⁴, 10⁵, 10⁶ e 10⁷ UFCs. Para o controle do número de colônias dos inóculos, foram transferidos 100 µL de uma diluição de 10² UFC/mL para uma placa de meio LB e incubada a 37 °C por 18-24h para a contagem de aproximadamente 100 UFCs (VIEGAS *et al.*, 2013) (Figura 7).

Um volume de 10 µL das diferentes concentrações das suspensões bacterianas (10⁴, 10⁵, 10⁶ e 10⁷ UFCs/larva) foram inoculadas em grupos diferentes de 10 larvas cada através da região da última propata ventosa, conhecida como “falsa-pata”, inferior esquerda da larva, com o auxílio de uma micro seringa e uma plataforma de apoio, mediante a assepsia com álcool 70% na região da inoculação, sem provocar uma pressão excessiva na região do inóculo para não causar um estresse desnecessário à larva. Para um controle adicional, grupos de larvas não manipuladas, larvas apenas perfuradas e larvas injetadas com apenas 10 µL de PBS também foram incluídos

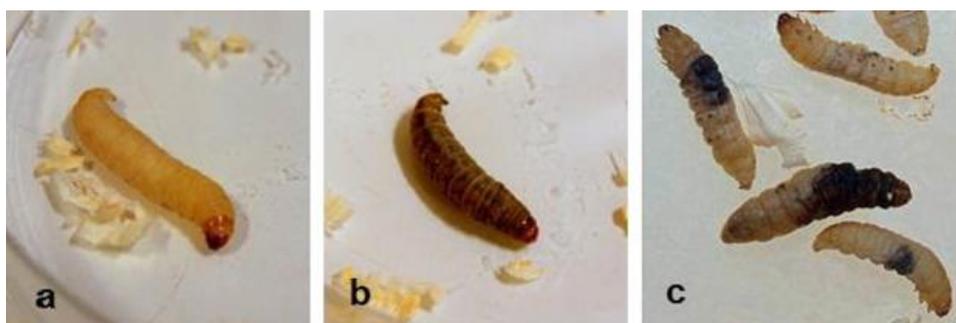
para acompanhar o estado de saúde das larvas durante todo o experimento (VIEGAS *et al.*, 2013; JORJÃO *et al.*, 2018).

Figura 7: Esquema de preparação de inóculos e sinais de morte das larvas de *Galleria mellonella*

1.



2.



Fonte: Presente estudo.

Legenda: 1. Esquema de diluição seriada para obter os inóculos das cepas de estudo com as concentrações 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 UFCs; 2. Sinais de morte das larvas de *Galleria mellonella* sendo A: Larva com aspecto saudável, B: Larva apresentando desidratação e C: Larva apresentando melanização.

Os resultados obtidos foram utilizados para gerar um gráfico de sobrevivência, relacionando a porcentagem de sobrevivência das larvas inoculadas com cada uma das concentrações e o tempo pós-infecção em dias desde a inoculação de cada grupo até a morte da larva, resultando na curva de morte, determinação da dose sub-letal das cepas testadas e estimativa das diferenças na sobrevivência e potencial virulento das cepas em diferentes concentrações. Os experimentos foram realizados em triplicada biológica. A dose letal mediana (LD_{50} do inglês *Lethal Dose*) do inóculo das cepas utilizadas no estudo (tabela 1) também foi determinada utilizando os inóculos correspondentes a 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 UFCs/larva com grupos de 10 larvas para cada concentração dos inóculos testados, monitoradas para o registro da mortalidade de

acordo com os sinais de morte. O cálculo da LD₅₀ foi realizado por regressão logística em uma plataforma online *Quest Graph™ LD₅₀ Calculator* (AAT Bioquest, Inc, <https://www.aatbio.com/tools/ld50-calculator>) relacionando o número de mortes durante o ensaio e as concentrações dos inóculos estudados para gerar a curva sigmoideal e determinar a equação da sua função.

Figura 8: Processo de inoculação das larvas de *G. mellonella*.



Fonte: Acervo do autor.

7.7 Identificação *in silico* dos fatores de virulência

A avaliação do repertório de fatores de virulência das cepas utilizadas no ensaio de infecção do presente estudo, C156 e ATCC43864, que apresentam genomas públicos disponíveis, foi realizada utilizando ferramenta da plataforma online PATRIC, que identifica genes de referência coletados de bancos de dados externos (Victors e VFDB) ou curados no PATRIC e mapeados para seus homólogos com base na similaridade de sequência usando BLASTP, em seguida os repertórios de fatores de virulência identificados de cada cepa foram analisados e comparados manualmente.

8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A amostra clínica bacteriana utilizada neste estudo foi coleta pelo projeto de vigilância e monitoramento de resistência bacteriana: *Acervo Microbiológico para Implantação de Programa de Vigilância e Estudo da Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos: Estudo genético dos Determinantes de Resistência Antimicrobiana entre Isolados Clínicos Bacterianos* (CAAE: 45080915.0.3001.5208) em parceria com o Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

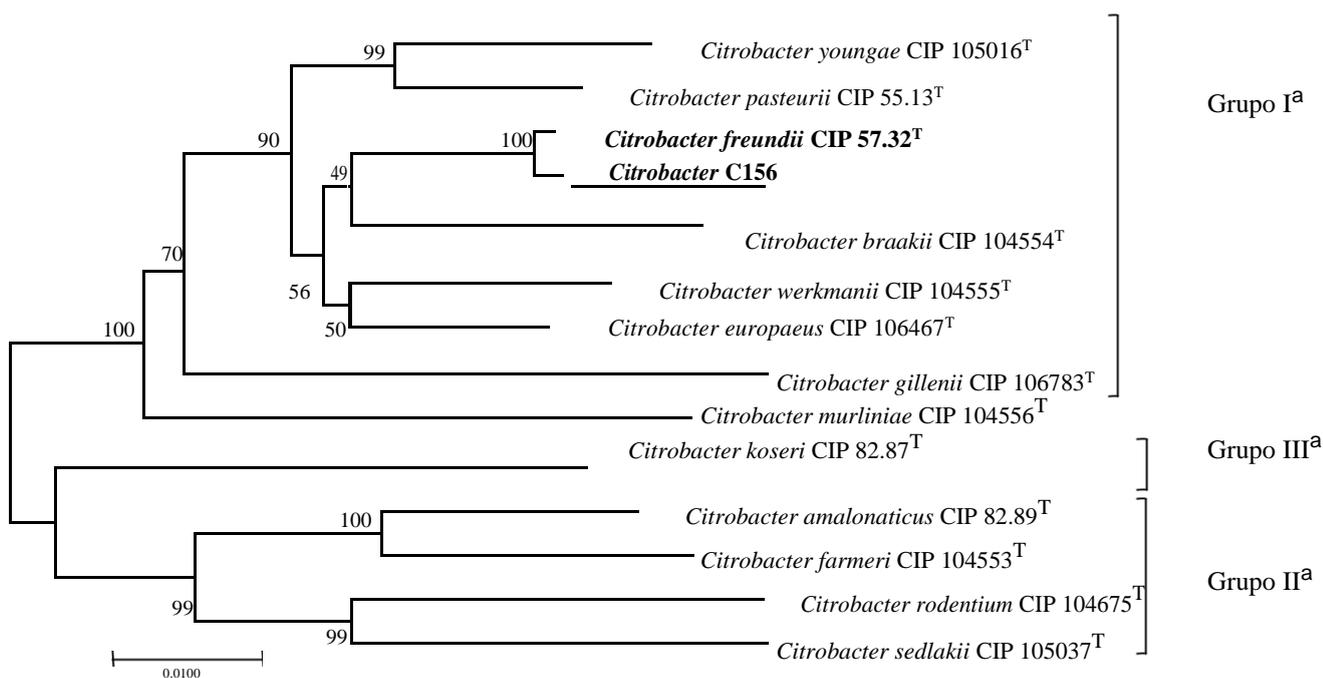
9 RESULTADOS

9.1 Identificações da espécie da cepa *Citrobacter* C156 por *Multilocus Phylogenetic Analysis*

As sequências dos genes *rpoB*, *fusA*, *pyrG* e *leuS* das cepas de referência (cepas tipo^T) de 13 diferentes espécies de *Citrobacter* spp. e da cepa C156 foram obtidas, concatenadas em 2.082 pb e seu alinhamento utilizado para a confecção da árvore filogenética (Figura 7). A topologia apresentada pela árvore filogenética construída neste estudo, foi semelhante àquelas previamente determinadas por MLPA utilizando os mesmos quatro genes *housekeeping* (RIBEIRO *et al.*, 2017; CLERMONT *et al.*, 2015) de *Citrobacter* spp., com ramos filogenéticos bem definidos e as espécies agrupadas nos seus respectivos grupos (I, II e III) formados por análises prévias baseadas nas sequências do gene da RNA ribossomal 16S (16S rRNA) de *Citrobacter* spp. (Figura 7)(RIBEIRO *et al.*, 2017; CLERMONT *et al.*, 2015).

A cepa *Citrobacter* C156 e a cepa CIP 57.32^T de *C. freundii* formaram juntas um ramo filogenético independente e bem definido, suportado por um valor de *bootstrap* de 100%, indicando que a cepa *Citrobacter* C156 pertence a espécie *Citrobacter freundii*, pertencentes ao grupo I, que inclui as espécies *C. youngae*, *C. europaeus*, *C. pasteurii*, *C. braakii*, *C. werkmanii*, *C. gilleni* e *C. murlinae*.

Figura 9: Árvore filogenética baseada no alinhamento das sequências de nucleotídeos concatenadas dos quatro genes *housekeeping* de cepas referências (tipo) das espécies de *Citrobacter* spp. incluindo a cepa teste C156.



Fonte: Acervo do autor. **Nota:** Barra: 1% de alteração de nucleotídeos. Em destaque (**sublinhado e em negrito**), posicionamento da cepa C156 na árvore filogenética, próximo à posição da cepa *C. freundii* CIP 57.32^T (**em negrito**); ^a Indicação das espécies dos Grupos I, II e III definidos por CLERMONT *et al.* (2015) em análise filogenética baseada nas sequências do gene que codifica o 16S rRNA.

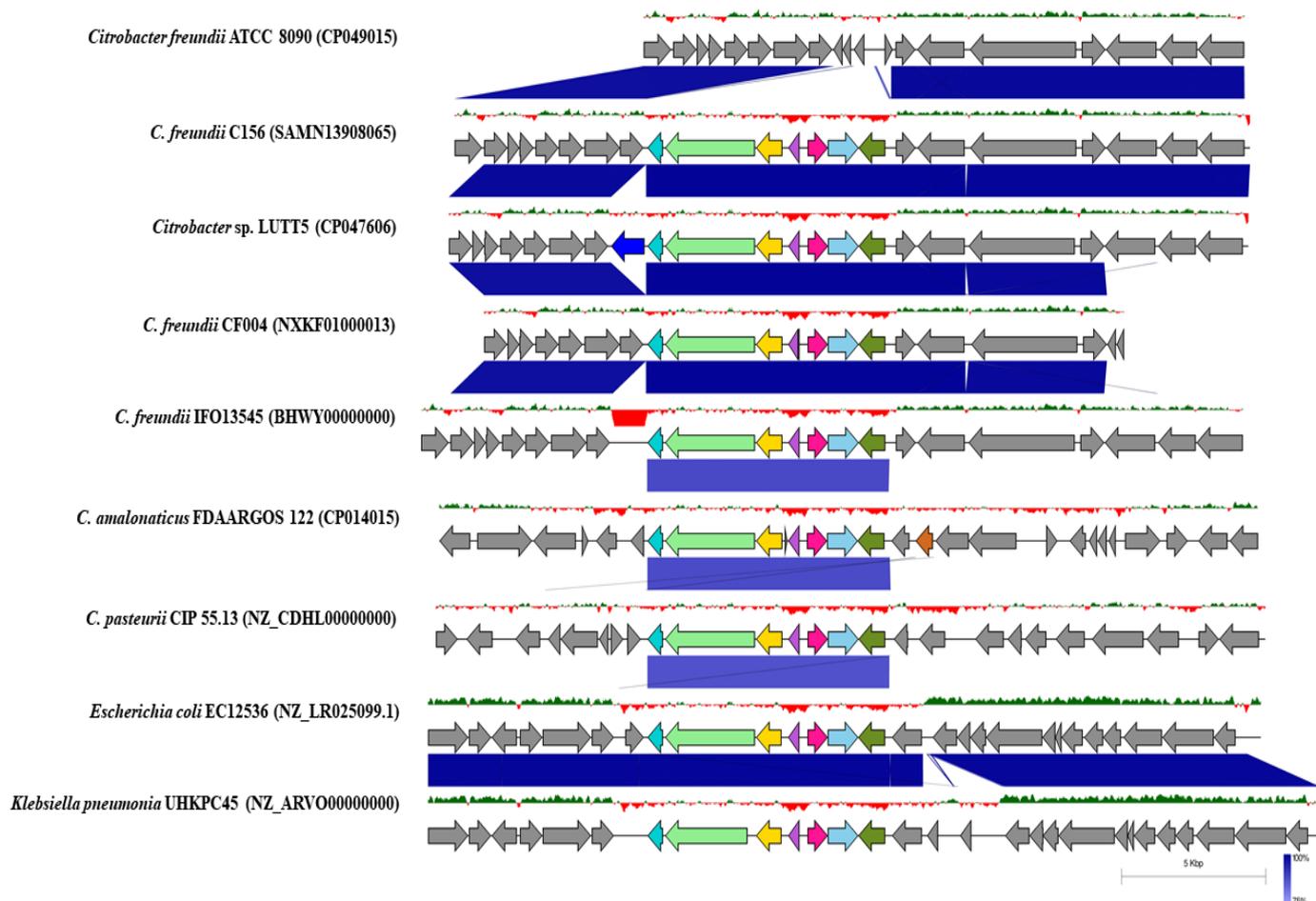
9.2 Suscetibilidade à polimixina

O perfil de suscetibilidade da cepa *Citrobacter freundii* C156 à colistina foi determinado por microdiluição em caldo, onde foi possível confirmar o seu alto nível de resistência com um CIM de 256 µg/mL para colistina.

9.3 Caracterização do contexto genético de *crrAB* em Enterobacteriaceae

O relatório gerado por SyntTax com a topologia da região do *locus crrAB* demonstrou que o mesmo está presente em diferentes espécies de Enterobacteriaceae presentes no banco de dados do servidor SyntTax atualizado diariamente de acordo com o NCBI, e compreende os genes preditos, como é possível observar na Figura 8, que codificam uma N-acetiltransferase, uma subunidade transportadora de bomba de efluxo de múltiplas drogas do tipo RND (KerD), uma proteína de membrana, o transportador CrrC, as proteínas CrrA e CrrB e o gene que codifica uma glicosiltransferase. Foram identificados ainda diferentes elementos móveis flanqueando a região em alguns desses genomas de diferentes espécies, como putativas integrase e recombinase associados a esse *locus* em *K. pneumoniae* MGH 78578, Kp13 e UHKPC33, na cepa *K. pneumoniae* WCHKP 2080 foi identificado um elemento semelhante a IS5 (ISKpn26) interrompendo a proteína de membrana. A Figura 9 gerada pelo software Easyfig para comparação do arranjo genético da região do *locus crrAB*, incluindo o da cepa *Citrobacter freundii* C156, demonstrou que os genes que a região do *locus* compreende estão ausentes na cepa *C. freundii* ATCC 8090, sendo encontrado nessa posição do genoma genes que codificam para uma proteína do sistema toxina-antitoxina da família CcdA, CcdB, proteína hipotética e uma proteína similar ao regulador de transcrição da família CopG, e encontrados no mesmo *locus* em outras cepas de *C. freundii*, mas em *locus* diferentes em *C. amalonaticus* e *C. pasteurii* (Figura 9). A cepa EC12536 de *E. coli*, por sua vez, também apresenta a região *crrAB* em um *locus* correspondente da cepa UHKPC45 de *K. pneumoniae*. Ainda é possível observar na Figura 9 que as cepas *Citrobacter* sp LUTT5 e *C. amalonaticus* FDAARGOS 122, apresentaram nas extremidades do *locus*, os elementos móveis transposase do tipo IS30 e integrase / recombinase, respectivamente.

Figura 11: Comparação do arranjo genético da região do locus *crrAB*



Legenda: As regiões com genes semelhantes entre os genomas são coloridos. Da esquerda para a direita: N-acetiltransferase (azul claro); Subunidade transportadora de bomba de efluxo de múltiplas drogas do tipo RND (KerD) (verde claro); Proteína de membrana (amarelo); Transportador CrrC (roxo); CrrA (rosa); CrrB (azul celeste, destacado em negrito no centro); Glicosiltransferase (verde oliva); Transposase IS30 (azul escuro) e integrase / recombinase (marrom).

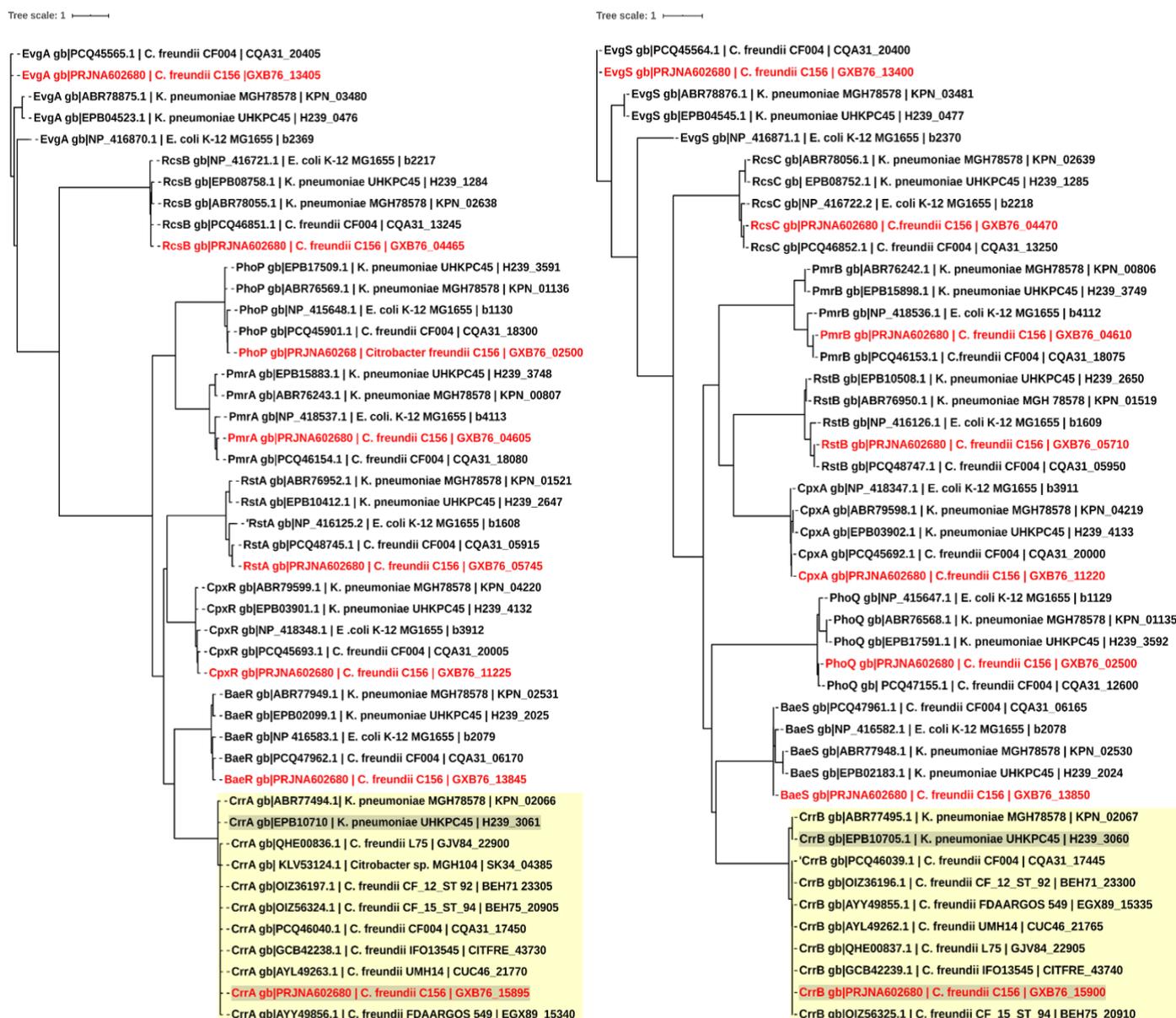
Nota: Representação gráfica da comparação do arranjo genético. As barras azuis entre as sequências indicam as correspondências entre elas de acordo com o BLAST, o gradiente da coloração azul à direita indica a identidade que varia de 75% a 100%. As espécies e identificação das cepas estão indicadas à esquerda. As setas indicam o sentido de tradução das sequências.

9.4 Relação filogenética de CrrAB e outros *Two Component Systems* de Enterobacteriaceae

As árvores filogenéticas das sequências das proteínas CrrA e CrrB foram geradas (Figura 10) onde foi possível observar que as proteínas do TCS CrrAB de *C. freundii*, especialmente da cepa C156, agruparam próximo as proteínas CrrA e CrrB de *K. pneumoniae*, confirmando se tratar de ortólogos, foi possível ainda distinguir as proteínas desse sistema com a de outros TCS's de espécies de Enterobacteriaceae, como PhoPQ, PmrAB, RcsAB, RstAB, EvgAS, CpxAR e BaeSR, dada a distância do agrupamento das proteínas desses TCSs. A comparação da sequência de

aminoácidos das proteínas CrrA e CrrB de diferentes genomas disponíveis no NCBI de espécies de *C. freundii* e *K. pneumoniae* demonstrou que as proteínas de CrrAB, especialmente a proteína CrrB, apresentam motivos bastante conservados entre os genomas, representados na figura 10 B por regiões coloridas graficamente com a mesma cor. Sendo possível ainda observar a modificação do aminoácido A91T no domínio HAMP da proteína CrrB da cepa de estudo C156.

Figura 12: Filogenia das proteínas CrrA e CrrB e das proteínas de outros TCS's envolvidas na resistência à polimixina.

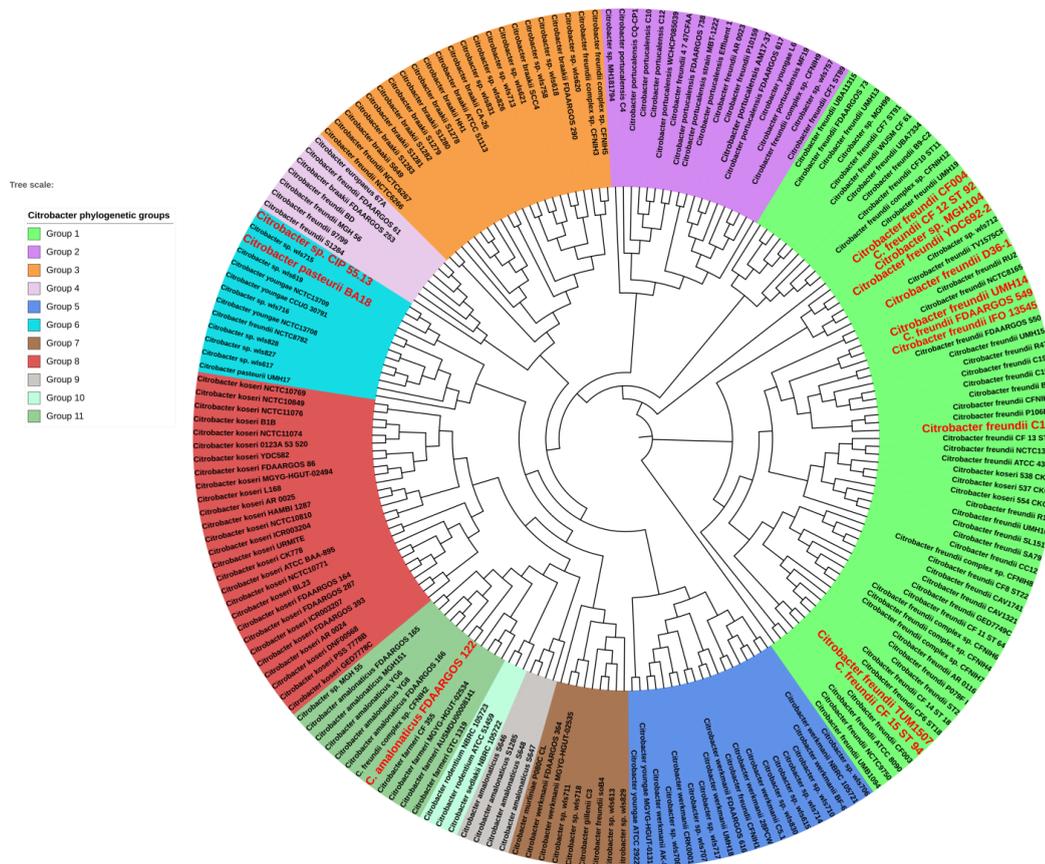


Fonte: Presente estudo.

Note: Os putativos TCSs (HKs e RRs) da cepa de *C. freundii* C156 são rotulados em vermelho; as proteínas CrrA e CrrB são destacadas em cinza e seu clado

diferenciados em cores, estando a cepa de estudo C156 no Grupo Filogenético 1, destacado em verde, grupo esse que agrupou a maioria dos genomas da espécie *C. freundii*, assim como a maioria dos genomas positivos para o TCS CrrAB, destacados na imagem com fonte vermelha. A filogenia de 79 genomas apenas da espécie *Citrobacter freundii* do grupo 1, utilizando os mesmos parâmetros da árvore anterior com base em 494 genes principais de cópia única foi realizada, assim como a árvore pelo método *Neighbor-joining* de acordo com o tipo de sequência MLST (ST) definida a partir das sequências nucleotídicas concatenadas dos alelos dos genes *aspC*, *clpX*, *fadD*, *mdh*, *arcA*, *dnaG* e *lysP*. É possível observar nas árvores A e B da Figura 13, destacado com fonte de diferente cores, genomas positivos para o TCS CrrAB e suas respectivas ST. No total, seis ST diferentes foram identificadas entre os genomas positivos, sendo elas: ST 396, ST 212, ST 185, ST 156, ST 125 e a ST 117 a qual a cepa C156 pertence. A topologia das árvores estimadas e analisadas demonstraram que a distribuição do TCS CrrAB se deu de forma variável em cepas geneticamente distantes.

Figura 14: Filogenia de 1.000 genes principais de cópia única compartilhados por 200 cepas de *Citrobacter*.



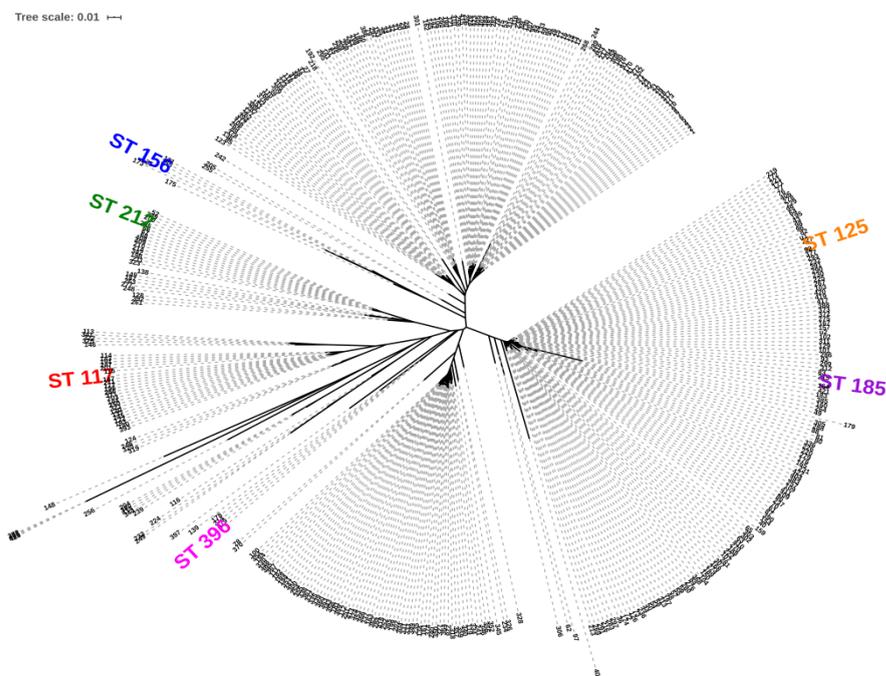
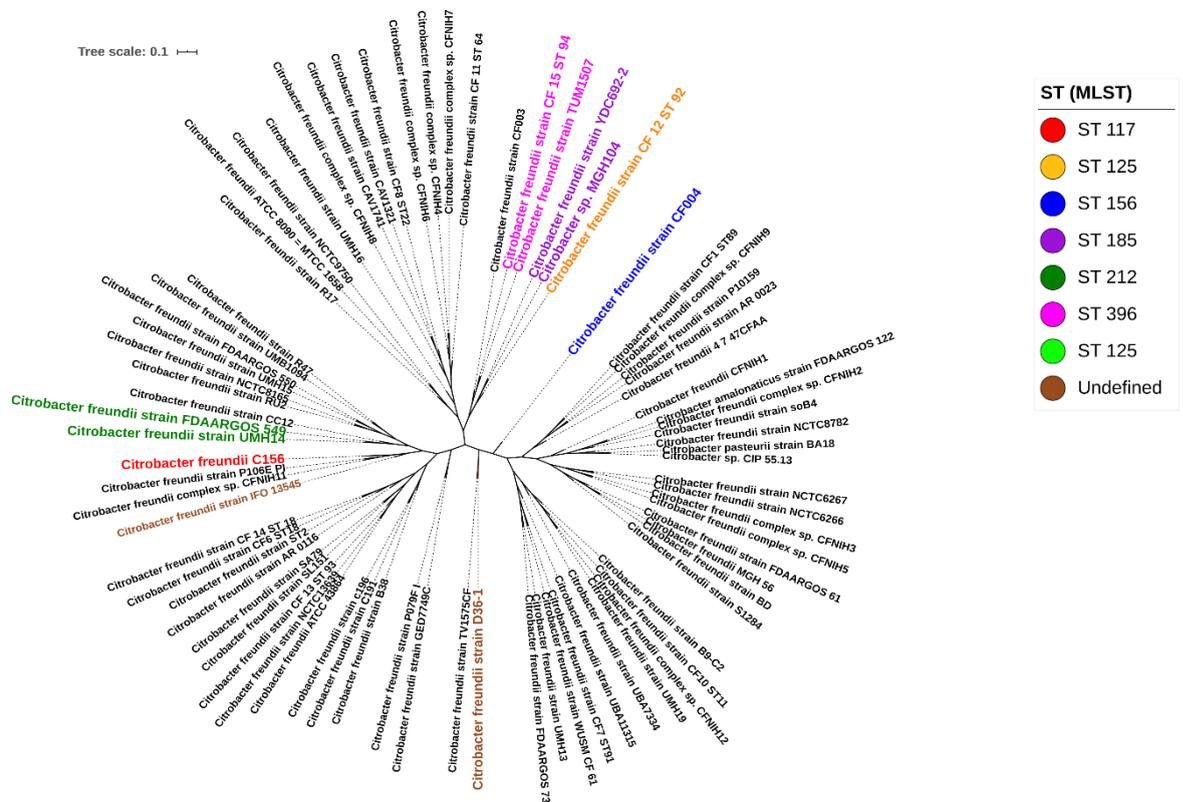
Fonte: Presente estudo.

Legenda: Destacado em vermelho as estirpes de *Citrobacter* positivas para o sistema CrrAB.

Nota: Estimativa de árvore de máxima verossimilhança construída usando RAXML com base em 1000 genes principais de cópia única compartilhados por 200 cepas de *Citrobacter*.

Figura 15: Filogenia de cepas de *Citrobacter freundii* de acordo com o ST.

A.



B.

Fonte: Presente estudo

Legenda: Destacado em cores as cepas positivas para o sistema CrrAB de acordo com a sua ST; MLST, digitação de sequência *Multilocus*; ST, tipo de sequência.

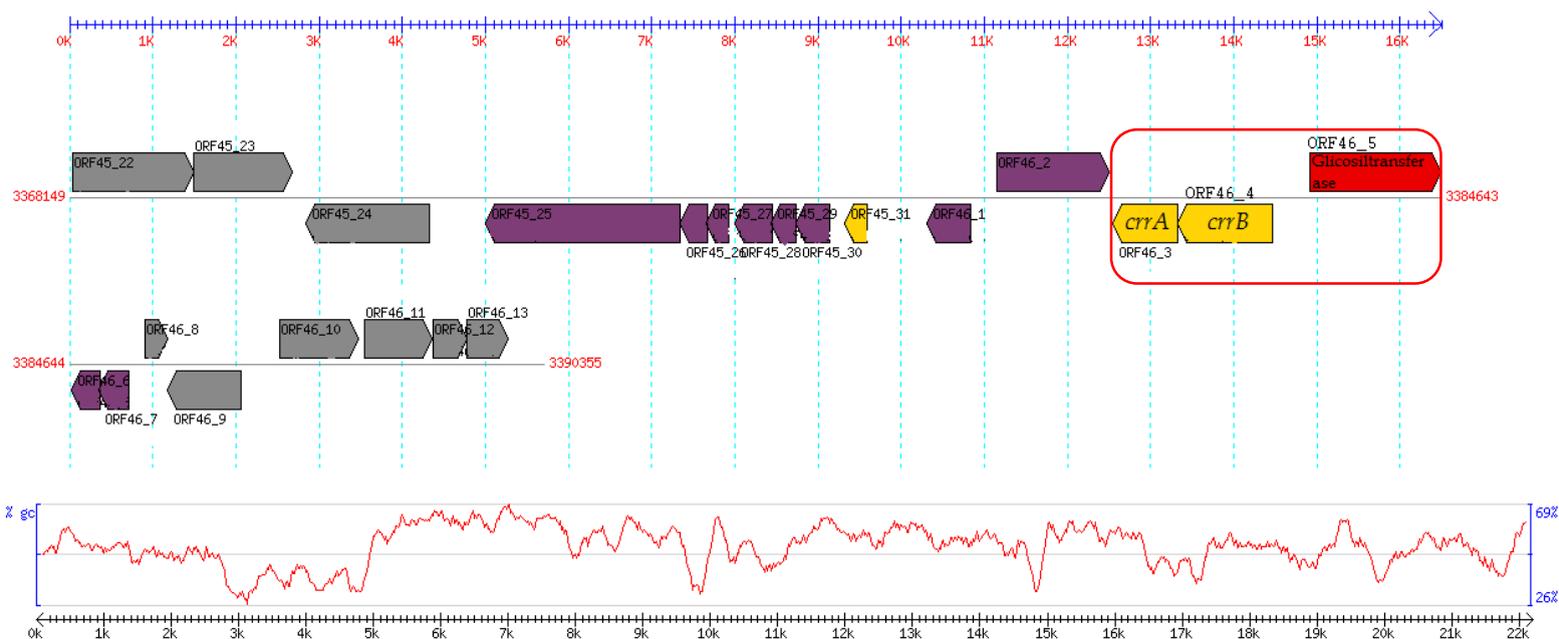
Nota: A= Estimativa de árvore de máxima verossimilhança construída usando RAxML com base em 1.000 genes principais de cópia única compartilhados por 79 cepas de *Citrobacter freundii*; B= Estimativa de árvore de acordo

com as sequências nucleotídicas concatenadas de alelos de loci do esquema de *Citrobacter freundii* MLST (*aspC*, *clpX*, *fadD*, *mdh*, *arcA*, *dnaG* e *lysP*).

9.6 Análise do mobiloma da cepa *Citrobacter freundii* C156

A análise quanto a mobilidade da região em que o *locus crrAB* está inserido foi realizada utilizando a ferramenta online VRprofile que realiza pesquisas de homologia rápidas de sequências do genoma de consulta contra o banco de dados MobilomeDB com base na similaridade da sequência de proteína e na ordem do gene. Identificou-a como uma região relacionada a profago, composta por: PTS mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IIB, PTS system IIC component, PTS system IID component, Theroninedehydrogenase-like Zn-dependent dehydrogenase, Shikimate 5-dehydrogenase, Ribosomal-protein-S5-alanine N-acetyltransferase, proteína hipotética, *crrC* e Peptidase S51 dispeptidase, como é possível observar na Figura 14, em roxo. Em amarelo, no centro da região os genes *crrA* e *crrB* foram identificados como genes relacionados a resistência bacteriana, em vermelho, a glycosyltransferase foi reconhecidos como fator de virulência e em cinza 5 Kb das regiões flaqueadoras. O perfil do conteúdo GC da região 2, incluindo os genes *crrAB*, apresentou diferenças da porcentagem média do genoma que variaram de > 20% de diferença a < - 20% como demonstrado na Figura 15.

Figura 16: Composição da região de profago.



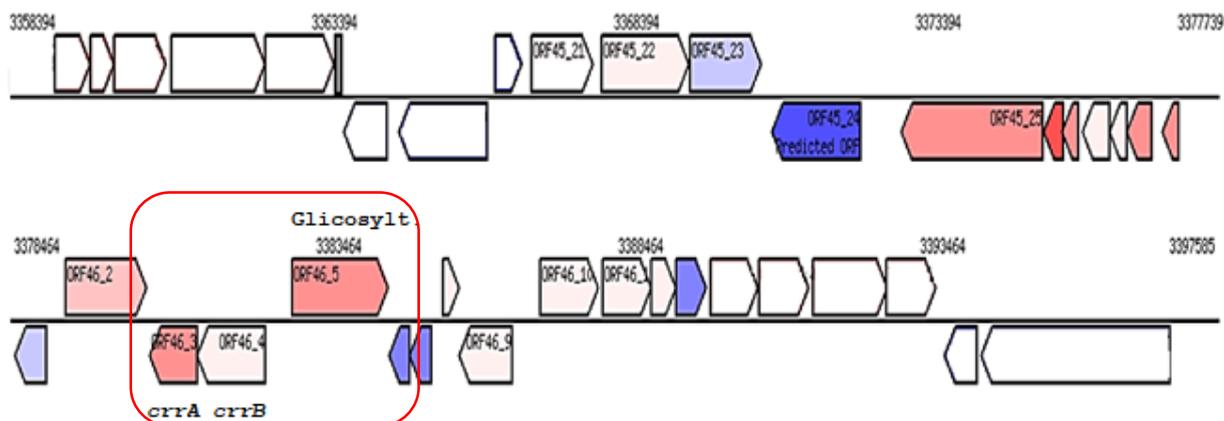
Fonte: Presente estudo.

Legenda: Em cinza, da esquerda para a direita as regiões flaqueadoras: Transcriptional regulator DeoR family (ORF45_22), 3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein) reductase (ORF45_23), PTS system IIA component (ORF45_24), Na/Pi-cotransporter II-related protein (ORF46_8), Methioninesyntase (ORF46_9), Isocitrate dehydrogenase Kinase/phosphatase (ORF46_10), Isocitrate lyase (ORF46_11), Malate synthase (ORF46_12) e Sugar (Glycoside-pentoside-hexuronide) transporter (ORF46_13); Em roxo, da esquerda para a direita regiões de profago: PTS mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific

component IIB (ORF45_25), PTS system IIC component (ORF45_26), PTS system IID component (ORF45_27), Theroninedehydrogenase-like Zn-dependent dehydrogenase (ORF45_28), Shikimate 5-dehydrogenase (ORF45_29), Ribosomal-protein-S5-alanine N-acetyltransferase (ORF45_30), Predicted ORF (ORF46_1), **crrC (ORF46_2)**, Predicted ORF (ORF46_6) e Peptidase S51 dispeptidase E (ORF46_7); Em amarelo, da esquerda para a direita os genes de resistência: RND protein (ORF45_31), **crrA (ORF46_3)** e **crrB (ORF46_4)**; Em vermelho gene reconhecido como fator de virulência: **Glycosyltransferase (ORF46_5)**.

Nota: Representação gráfica dos genes da região de profago 2, da cepa C156, classificados por cor de acordo com sua predição de função.

Figura 17: Porcentagem de diferença do conteúdo GC da região



Cor	Conteúdo G + C	Diferente do conteúdo médio de G + C do genoma
■	> 0,716	> 20%
■	0,716 ~ 0,616	10% ~ 20%
■	0,616 ~ 0,566	5% ~ 10%
■	0,566 ~ 0,536	2% ~ 5%
■	0,536 ~ 0,496	-2% ~ 2%
■	0,496 ~ 0,466	-5% ~ -2%
■	0,466 ~ 0,416	-10% ~ -5%
■	0,416 ~ 0,316	-20% ~ -10%
■	<0,316	<-20%

Fonte: Presente estudo.

Legenda: Em cinza, da esquerda para a direita as regiões flaqueadoras: Transcriptional regulator DeoR family (ORF45_22), 3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein) reductase (ORF45_23), PTS system IIA component (ORF45_24), Na/Pi-cotransporter II-related protein (ORF46_8), Methioninesyntase (ORF46_9), Isocitrate dehydrogenase Kinase/phosphatase (ORF46_10), Isocitrate lyase (ORF46_11), Malate synthase (ORF46_12) e Sugar (Glycoside-pentoside-hexuronide) transporter (ORF46_13); Em roxo, da esquerda para a direita regiões de profago: PTS mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IIB (ORF45_25), PTS system IIC component (ORF45_26), PTS system IID component (ORF45_27), Theroninedehydrogenase-like Zn-dependent dehydrogenase (ORF45_28), Shikimate 5-dehydrogenase (ORF45_29), Ribosomal-protein-S5-alanine N-acetyltransferase (ORF45_30), Predicted ORF (ORF46_1), **crrC (ORF46_2)**, Predicted ORF (ORF46_6) e Peptidase S51 dispeptidase E (ORF46_7); Em amarelo, da esquerda para a direita os genes de resistência: RND protein (ORF45_31), **crrA (ORF46_3)** e **crrB (ORF46_4)**; Em vermelho gene reconhecido como fator de virulência: **Glycosyltransferase (ORF46_5)**.

Nota: Representação gráfica da variação da média do conteúdo GC da região de profago em relação à média do genoma da cepa C156.

A análise realizada com a ferramenta PHASTER identificou no genoma da cepa *C. freundii* C156 quatro (4) regiões putativas de profago, listados na Tabela 2, sendo elas: duas regiões de

ESSI 2, bacteriófago de *Cronobacter* spp., identificadas nas posições 1 e 4 da Tabela 2, foram identificados também um fago de *E. coli* não especificado de número 500465 e P1 de Enterobactéria. A região do TCS CrrAB, identificada como região relacionada à profago, está localizada no genoma próximo ao bacteriófago ESSI 2 de *Cronobacter* spp. na posição 1 da Tabela 2. Foram ainda identificados, utilizando a ferramenta PlasmidFinder, os grupos de incompatibilidade: IncH2 (BX664015), RepA (CP011611), ColRNAI (DQ298019) e IncHI2A (BX664015).

Tabela 2: Regiões de profago identificadas em *C. freundii* C156

	Bacteriófagos	Região	Conteúdo GC%
1	ESSI 2	GXB76_21575	50,13%
2	500465	GXB76_18905	50,65%
3	P1	GXB76_19125	46,51%
4	ESSI 2	GXB76_01165	51,46%

Tabela 3: Plasmídeos e seus grupos de incompatibilidade em *C. freundii* C156

Plasmídeos	Número de acesso	Identidade (%)
IncH12	BX664015	100 %
RepA	CP011611	80,3 %
ColRNAI	DQ298019	100%
IncHI2A	BX664015	100%

9.7 Análise de sobrevivência e determinação da LD₅₀ em modelo de infecção de larvas de *Galleria mellonella*

Antes da realização do ensaio de infecção com as larvas de *G. mellonella*, o ciclo de vida desse modelo, cultivado em condições laboratoriais padronizadas citadas no item 7.5 da metodologia deste trabalho, foi inteiramente acompanhado para observação do seu desenvolvimento e fases. A duração da fase larval apresentada foi de aproximadamente 45 dias, quando se inicia a fase subsequente de formação da pupa. Ao final de sua fase larval, a grande maioria das larvas cultivadas para este estudo possuía o tamanho esperado de aproximadamente 2,0 cm (Figura 16 A). Quanto à viabilidade, as mesmas apresentaram a movimentação característica em resposta ao toque, aspecto e cor indicativos de um bom estado imunológico (Figura 16 A e B).

Figura 18: Larvas de *Galleria mellonella* em estágio final da fase larval.

A.



B.



Fonte: Presente estudo.

Nota: A: Final da fase larval apresentando 2 cm de comprimento; B: Larvas com cor característica.

Os dados de mortalidade dos grupos de larvas infectadas com as variadas concentrações de inóculo das cepas de estudo foram utilizados para determinação da LD₅₀ por regressão logística e construção da curva sigmoide da relação *dose x resposta* (concentração do inóculo vs número de mortes), de acordo com a equação:

$$y = \frac{9,621}{1 + (48679,060)^x} - 1,310$$

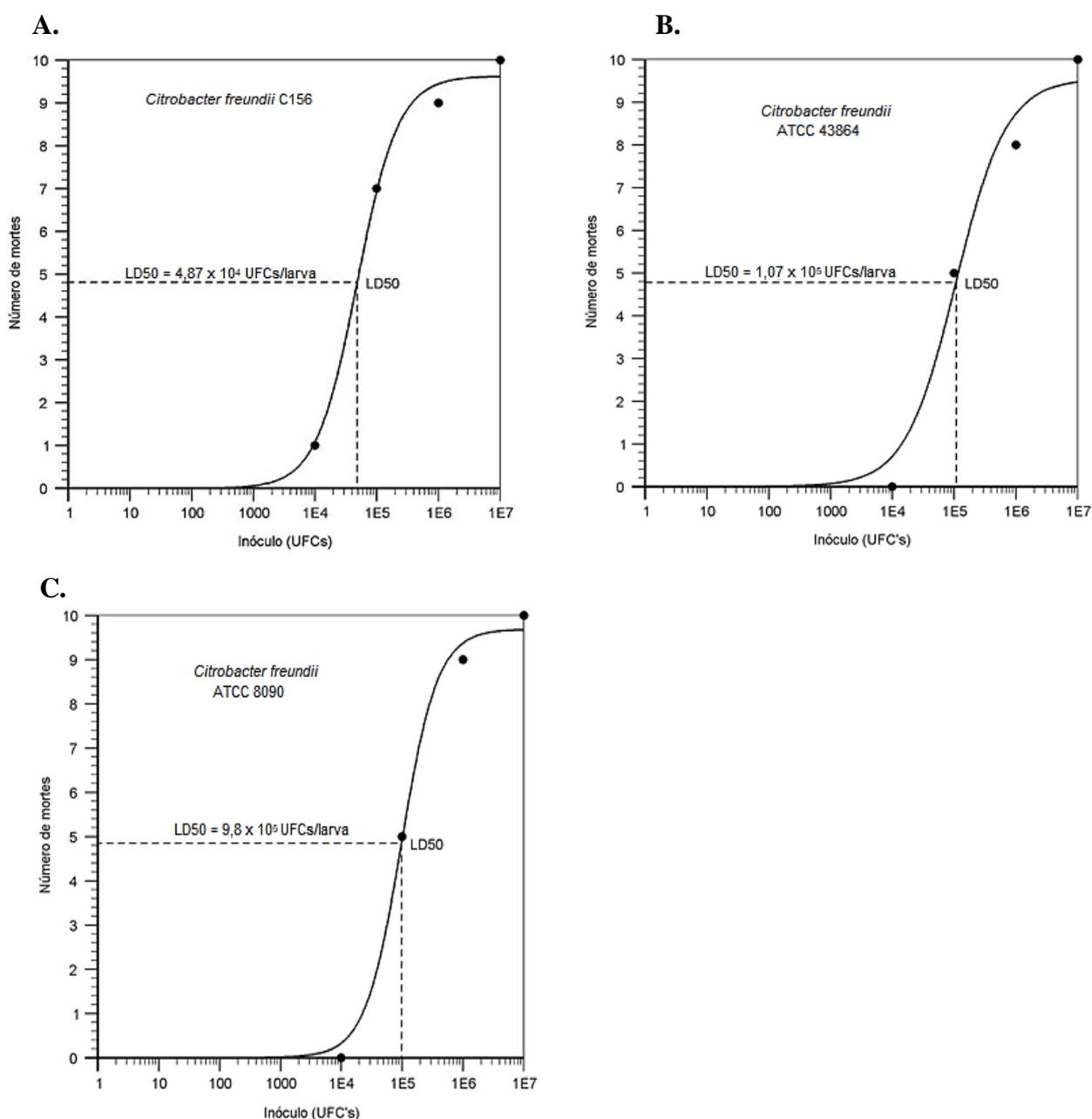
onde, x é a dose do inóculo bacteriano em UFCs da cepa C156 e y , número de larvas mortas depois do quinto dia de infecção. A LD₅₀ da cepa *C. freundii* C156 e das ATCC's *C. freundii* 8090 e *C. freundii* 43864 foi de $4,87 \times 10^4$ UFCs/larva, $9,8 \times 10^5$ UFCs/larva e $1,07 \times 10^5$ UFCs/larva, respectivamente, como é possível observar na curva de morte gerada com os resultados do ensaio de infecção com diferentes concentrações de inóculo (Figura 17 A, B e C).

Como demonstrado no gráfico de sobrevivência 'A' da Figura 18, a infecção produzida por um inóculo da cepa *Citrobacter freundii* C156 correspondente a 1×10^7 UFCs/larva resultou na morte de 100% (10) das larvas desse grupo após as primeiras 24 horas de infecção (DPI = 1). As infecções com inóculos contendo 10^4 , 10^5 e 10^6 UFCs da *C. freundii* C156 ocasionou a mortalidade de 10%, 70% e 90% das larvas, respectivamente, ao final do quinto dia de observação. O gráfico da Figura 18 B correspondente a cepa *C. freundii* ATCC 43864, por sua vez, demonstrou que o inóculo correspondente a 1×10^7 UFCs dessa cepa também levou a morte de 100% (10) das larvas no primeiro dia de observação, os inóculos de 10^5 e 10^6 UFCs apresentaram uma

porcentagem de mortalidade de 50% e 80% no último dia do ensaio, o inóculo de 10^4 UFCs não causou a morte de nenhuma larva do grupo inoculado com essa concentração da cepa.

O gráfico de sobrevivência da Figura 18 C corresponde ao ensaio de infecção da cepa *Citrobacter freundii* ATCC 8090, foi possível observar que a concentração do inóculo a 1×10^7 UFCs foi igualmente mortal para 100% (10) das larvas nas primeiras 24 horas após a infecção, o inóculo com 10^6 UFCs da cepa foi capaz de matar 70% das larvas do grupo durante o ensaio, já as concentrações de 10^4 e 10^5 UFCs não causaram mortes em seus respectivos grupos de larvas.

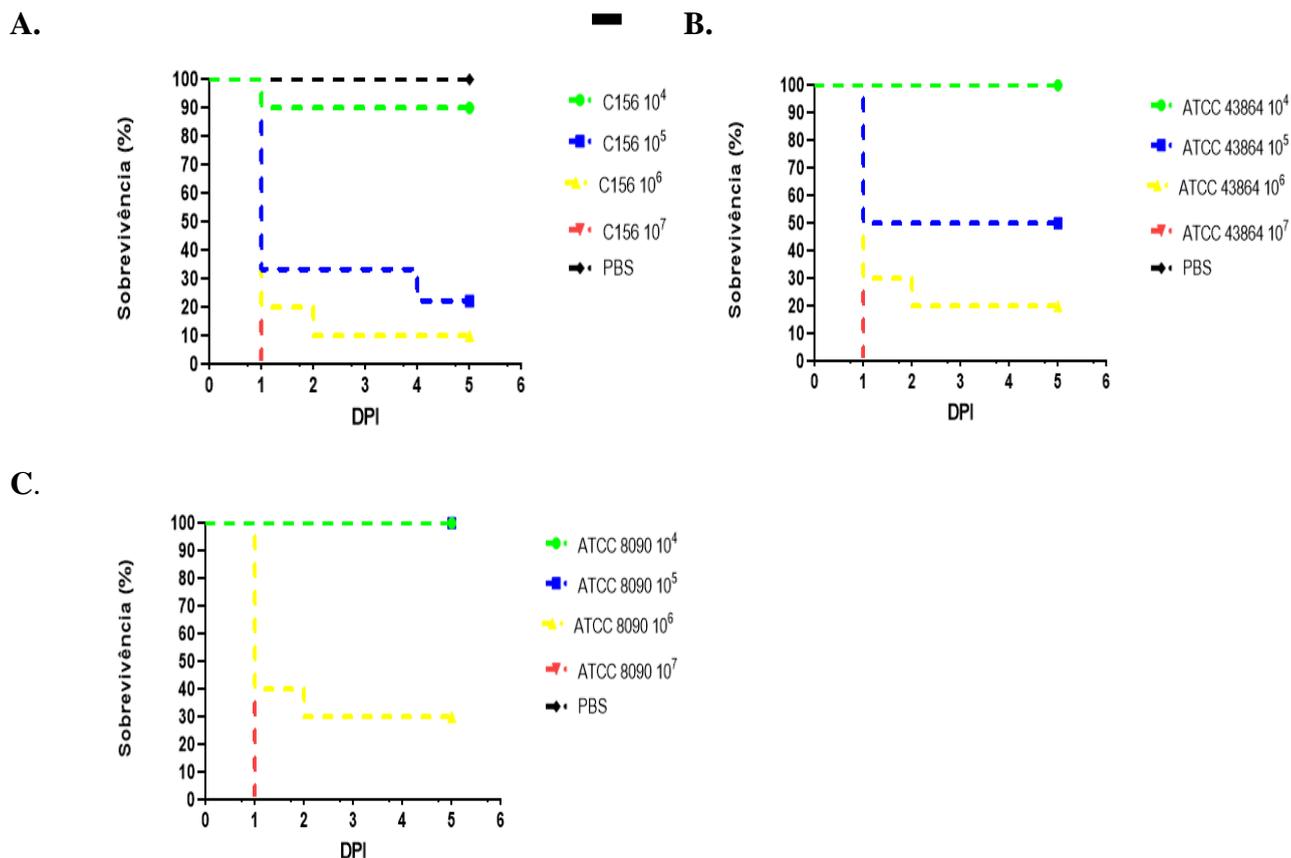
Figura 19: Equação da LD₅₀ das cepas *Citrobacter freundii* C156, *Citrobacter freundii* ATCC 43864 e *Citrobacter freundii* ATCC 8090.



Fonte: Presente estudo.

Legenda: UFC = Unidade formadora de colônia.

Figura 20: Gráfico de sobrevivência das larvas infectadas com as diferentes concentrações das cepas *Citrobacter freundii* C156, *Citrobacter freundii* ATCC 43864 e *Citrobacter freundii* ATCC 8090.



Fonte: Presente estudo.

Legenda: DPI = Dia pós-infecção; UFC = Unidade formadora de colônia.

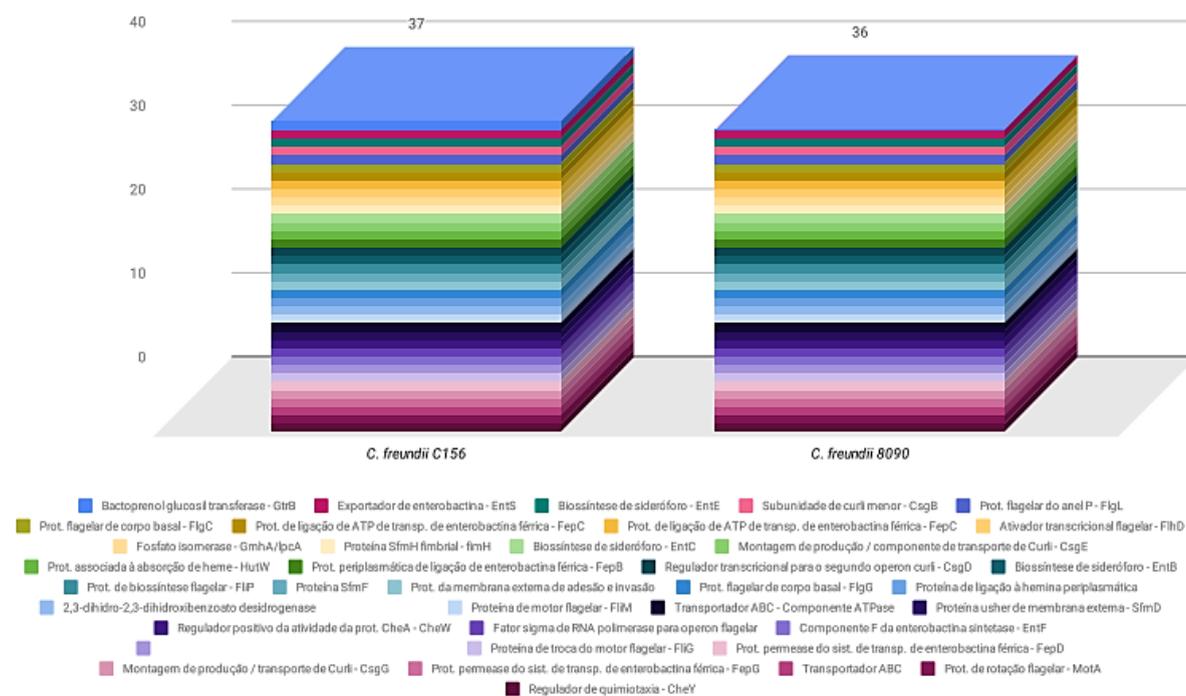
É possível observar nos gráficos da Figura 18 que em todos os ensaios os inóculos com 1×10^7 UFCs das cepas de *Citrobacter freundii* foram letais para as larvas de *G. mellonella*, passo que nenhuma larva inoculada apenas com solução PBS morreu durante o ensaio. Nos ensaios com os inóculos com 1×10^6 UFCs e 1×10^5 UFCs, a cepa *C. freundii* C156 causou a morte de 10% e 20% a mais de larvas quando comparada com a porcentagem de mortalidade causada pelas cepas *C. freundii* 43864 e *C. freundii* 8090, respectivamente, com a mesma concentração de inóculo.

Quando avaliada as porcentagens de mortalidade com o inóculo de 1×10^5 UFCs, a cepa C156 aumentou a diferença da porcentagem de mortes para 20% e 70% quando comparada com as cepas *C. freundii* 43864 e *C. freundii* 8090, respectivamente, com a mesma concentração de inóculo. Com o inóculo de 1×10^4 UFCs, a cepa C156 causou a morte de 10% a mais de larvas quando comparada com as demais cepas do ensaio. De modo geral, a cepa *C. freundii* C156 causou a morte de um maior número de larvas com diferentes concentrações de inóculo.

9.7 Identificação *in silico* dos fatores de virulência

Foram identificados na cepa de estudo *C. freundii* C156 genes codificadores de 37 fatores de virulência de *Citrobacter freundii*, sendo eles identificados como fatores relacionados com a aderência e motilidade, com flagelos, proteínas de biossíntese flagelar e proteínas relacionadas com o motor flagelar de *Yersinia*, fímbria e proteína de adesão e invasão de *Salmonella*. Foram identificados também fatores de evasão do sistema imune (capsula), aquisição e captação de ferro, sideróforos de *E. coli*, Sistema de Secreção do tipo T6SS e endotoxinas.

Figura 21: Gráfico com os fatores de virulência das cepas do estudo.



Fonte: Presente estudo. **Legenda:** Empilhados em cada uma das colunas estão os fatores de virulência de cores diferentes de acordo com a legenda do gráfico. Na horizontal na parte inferior de cada coluna estão identificadas as cepas do estudo, na parte superior de cada coluna estão identificados o número de fatores de virulência.

Foi possível observar ainda que cepa *C. freundii* 8090, que dispõe do genoma público disponível, apresenta em seu repertório de fatores de virulência, os mesmos fatores da cepa C156, totalizando 36 fatores como é possível observar na Figura 19, com a diferença de um único fator, o gene *gtrB*, envolvido na modificação do antígeno O, participa do agrupamento de três genes com os genes *gtr* e *gtrA* e codifica a adição de um resíduo de glicose ao antígeno O, resultando na soroconversão em *Shigella*. O gene *gtrB* foi encontrado ainda na maioria dos genomas positivas

para o TCS CrrAB, assim como na maioria dos genomas negativos para CrrAB utilizados no presente estudo.

10. DISCUSSÃO

Entre as infecções causadas por bactérias do gênero *Citrobacter*, a espécie *Citrobacter freundii* é o agente etiológico mais comumente encontrado causando quadros infecciosos, as demais espécies, como *C. youngae* e *C. braakii*, raramente são reconhecidas como o agente etiológico causando infecções (LIU *et al.*, 2017). De forma pouco frequente, mas crescente, estirpes da espécie *C. freundii* têm adquirido características patogênicas como fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos, especialmente àqueles considerados “última escolha” ou “último recurso” terapêutico para infecções causadas por bactérias Gram-negativas como a classe das polimixinas (LI *et al.*, 2017).

As alterações cromossômicas em sistemas de dois componentes como o PmrAB, o PhoPQ e o sistema mais recentemente descrito CrrAB, que resultam na neutralização da carga negativa do LPS, sítio de ligação das polimixinas, por 4-amino-4-desoxi- L- arabinose (Ara4N) e fosfoetanolamina (PEtN), são atualmente os mecanismos mais comuns relatadas de aquisição de resistência à polimixina. As análises filogenéticas das proteínas do sistema CrrAB, a quem foi atribuído a causa do alto grau de resistência à colistina, confirmado com um CIM de 256 µL/mL nesse estudo, da cepa *Citrobacter freundii* C156, confirmou se tratar de ortólogos de *Klebsiella pneumoniae* espécie onde o TCS CrrAB foi caracterizado causando resistência à colistina no estudo de Wright e colaboradores em 2015.

Foi possível ainda observar a substituição de uma alanina por treonina na posição 91 (A91T), na interface do domínio HAMP da proteína CrrB. Mutações pontuais na proteína CrrB, especialmente nesse domínio são observadas em estudos como o de Cheng *et al.* (2016) relacionados com a aquisição de resistência às polimixinas, além de outros estudos epidemiológicos que avaliaram isolados clínicos de *K. pneumoniae* com mutações similares (WRIGHT *et al.*, 2015, JAYOL *et al.*, 2017).

De acordo com o observado no estudo de sintonia, o locus *crrAB* da cepa *C. freundii* C156 está inserido em uma região que compreende os genes que codificam uma N-acetiltransferase, uma proteína de membrana, o transportador CrrC, as proteínas CrrA e CrrB, o gene que codifica uma glicosiltransferase e uma subunidade transportadora de bomba de efluxo de múltiplas drogas do tipo RND (KerD). Essa composição é observada em quase todos os genomas de Enterobacteriaceae disponíveis positivos para *crrAB*, mas em contextos diferentes de acordo com o genoma.

Sabe-se que CrrAB está presente na maioria dos genomas de *K. pneumoniae* e em algumas linhagens de Enterobacteriaceae, no presente estudo quando comparada a sequência de aminoácidos das proteínas do sistema foi possível observar que apresentam motivos conservados

entre diferentes espécies de diferentes gêneros, incluindo *Citrobacter*. Quando analisada a distribuição dos genes que codificam o sistema em genomas públicos disponíveis apenas de *Citrobacter*, os mesmos são encontrados também de maneira variável nos genomas das espécies do gênero, como foi possível observar na árvore estimada na Figura 12, o que é igualmente observado quando analisado a distribuição do operon *crrAB* nos genomas da espécie *C. freundii*, as árvores da Figura 13 apontam ainda a ocorrência variável dos genes *crrAB* em linhagens (STs) de *C. freundii*, geneticamente distantes.

Na topologia da árvore da Figura 12 foi possível observar a formação de 11 grupos filogenéticos para as espécies do gênero *Citrobacter*, o mesmo foi observado na estimativa de árvore de máxima verossimilhança com base em 1450 genes principais de cópia única compartilhados por 129 estirpes de *Citrobacter*, realizada por Yuan e colaboradores (2019) em seu estudo de análise genômica comparativa de genes relacionados a patogenicidade de *Citrobacter*. A cepa de estudo C156 está agrupada no grupo filogenético 1, o maior grupo composto inteiramente pela espécie *C. freundii*, no qual estão agrupadas cepas positivas para o sistema CrrAB, estando mais geneticamente próxima das estirpes IFO 13545, ST 212 UMH14 e FDARGOS 549, e mais geneticamente distantes de MGH104, YDC692-2 (ST 185), TUM1507, CF 15 ST 94 (ST 396), CF004 (ST 156) e D36-1. C. As estirpes *C. pasteurii* BA18 e *Citrobacter* sp. CIP 55.13, ambas do grupo filogenético 6, apresentam o *locus crrAB*-glicosiltransferase que compartilha 95% de identidade de nucleotídeos na região *crrAB* do *C. freundii* C156, enquanto no grupo filogenético 11, a estirpe *C. amalonaticus* FDAARGOS 122 compartilha 86,2% de identidade da região com o da cepa de estudo C156.

Os resultados alcançados acerca da distribuição dos genes *crrAB* no gênero *Citrobacter*, demonstraram que a sua ocorrência é variável a nível de linhagem. Quando analisado o conteúdo GC da região do *locus crrAB*, foi possível observar que é de 41%, o que é consideravelmente menor que o conteúdo médio de 51,5% para o cromossomo *C. freundii* (Yuan *et al.*, 2019), já a variação do conteúdo GC dessa região da cepa C156 em comparação à média do seu genoma foi de ~10%, o que junto com os resultados anteriores sugerem que essa região foi adquirida lateralmente por transmissão horizontal e não por transmissão vertical de um ancestral comum, podendo, portanto, apresentar uma certa mobilidade.

Na pesquisa sobre o mobiloma da cepa *C. freundii* C156, observamos que diferente da região *crrAB* de cepas como *Citrobacter freundii* UMH14 e FDARGOS549 que apresenta eventos de IS remodelando o *locus*, a região na cepa C156 foi identificada como uma região relacionada a profago com a ferramenta MobilomeDB, e identificada como região próxima ao fago ESSI 2 com a ferramenta PHASTER. É possível ainda que a inserção ou troca dessa região possa ocorrer por recombinação homóloga entre as regiões conservadas que flanqueiam esse *locus*, como proposto

por Cain *et al.* Em 2018, quando sugeriu que o *locus crrAB* foi trocado como uma única unidade entre linhagens diferentes por meio de recombinação homóloga em cepas que não apresentavam mobilidade aparente da região do *locus*.

Ainda durante a análise do mobiloma da cepa, foram identificados quatro (4) plasmídeos de grupos de incompatibilidades diferentes, o que caracteriza a cepa *C. freundii* C156 como um possível reservatório de determinantes de resistência como observado na cepa em estudo anterior de Araújo em 2018.

Uma vez que essa via de aquisição de resistência às polimixinas afetam a composição da membrana citoplasmática, reconhecido componente de virulência e patogenicidade da bactérias, foi observado o perfil de patogenicidade da cepa C156 em comparação o perfil das demais cepas do estudo a *Citrobacter freundii* ATCC 8090 e a *Citrobacter freundii* ATCC 43864, em infecção *in vivo*, utilizando o modelo de infecção não murino das larvas do inseto *Galleria mellonella*.

Durante o período de implantação do modelo no laboratório e preparação para a utilização das larvas no estudo, foi observado todo o ciclo de vidas do modelo, onde a duração da fase larval do inseto, período em que são utilizadas para os ensaios de infecção, foi de aproximadamente 45 dias, quando se iniciou a fase subsequente de formação da pupa, assim como observado por JORJÃO *et al.* (2018), onde as larvas cultivadas com a mesma dieta (ração de mesma composição) e mesma temperatura de incubação do presente estudo, apresentaram uma fase larval de aproximadamente 42 dias, no final da fase larval as larvas apresentavam o tamanho esperado de 2.0 cm com as devidas características de viabilidade, demonstrando a efetividade das condições de cultivo utilizadas

Os dados obtidos no ensaio de infecção com a cepa *Citrobacter freundii* C156 e demais cepas do estudo demonstram que as larvas *G. mellonella* susceptíveis a infecção por um grande número de bactérias, são também susceptíveis a infecção por *Citrobacter freundii*, especificamente pelas cepas do estudo. O gráfico de sobrevivência gerado com esses dados demonstrou ainda que a mortalidade das larvas infectadas se dá de forma dose-dependente, caracterizando as larvas de *Galleria mellonella* como um modelo animal sensível para a análise de virulência de patogenicidade de *Citrobacter freundii* nesse estudo.

A concentração de 1×10^7 UFCs/larva foi considerada a dose-letal para a cepa *C. freundii* C156 assim como para as demais cepas do estudo, as concentrações de 1×10^6 , 1×10^5 e 1×10^4 UFCs/larva da cepa C156 foram capazes de matar mais larvas de seus respectivos grupos quando comparadas com as mesmas concentrações das ATCC's 8090 e 43864, o que fez com que a cepa C156 apresentasse uma dose letal capaz de matar 50% das larvas (LD₅₀) de $4,87 \times 10^4$ UFCs/larva,

uma concentração menor quando comparada com as concentrações de LD₅₀ de 9,8 x 10⁵ UFCs/larva e 1,07 x 10⁵ UFCs/larva das cepas ATCC's 8090 e 43864, respectivamente.

De acordo com Esposito e colaboradores em 2018, em estudo similar utilizando cepas de *K. pneumoniae* resistentes a colistina por mutações em genes que codificam TCS's, a virulência no ensaio de infecção com larvas de *G. mellonella* se apresentou de maneira variável, com uma certa diminuição da virulência. O autor sugeriu ainda que a alta do CIM de colistina poderia prever uma diminuição na de infecciosidade dos isolados estudados.

Quando analisada o impacto da resistência à colistina por aquisição do gene *mcr-1* na aptidão bacteriana, o estudo de Tietgen *et al.* (2018) constatou que o gene *mcr-1* é capaz de causar um custo de adequação no perfil de virulência quando codificado em vetores de expressão e que a aquisição de natural de *mcr-1* plasmidal não prejudica a aptidão em *E. coli*, mas influencia negativamente as taxas de crescimento em *K. pneumoniae*.

No entanto, estudos como o de Matthew E. Wand , Lucy J. Bock e J. Mark Sutton (2017) sobre impacto da resistência à colistina por mutações em genes que codificam diferentes TCS's na virulência de *Klebsiella pneumoniae*, demonstraram que para essa espécie a resistência à colistina não causa um custo de adequação. Ainda segundo McConville e colaboradores em 2020, mutações em *crrB* ocasionando resistência às polimixinas, causam um aumento significativo da virulência a um custo de adequação.

A resistência à colistina por mutações nos TCS's PmrAB e PhoPQ em cepas de *Citrobacter* após indução por única exposição a 10 × CIM do antibacteriano, avaliada por Matthew E. Wand e J. Mark Sutton em 2020, resultou em uma diferença na taxa de crescimento e virulência em *G. mellonella* pouco relevante, constatando que a resistência estável à colistina pode ser adquirida sem perda de aptidão nessa espécie, o mesmo perfil foi observado na cepa *C. freundii* C156 demonstrando ainda uma vantagem no ensaio de infecção quando comparado com as demais cepas utilizadas.

Para avaliar se a virulência da cepa *C. freundii* C156 demonstrada durante os ensaios de infecção não estaria atrelado a alguma diferença na composição do repertório de fatores de virulência das cepas utilizadas, o mesmo foi analisado e observado que a cepa C156 apresentava um repertório bastante parecido com as demais, apresentando exatamente a mesma composição do repertório de fatores de virulência, com a diferença de um único gene, levando a uma associação mais forte do perfil de virulência da cepa C156, demonstrado durante as infecções nas larvas de *G. mellonella*, com o TCS CrrAB, uma vez que a porção do lipídeo A do LPS é um importante fator de ativação do sistema imune do hospedeiro e as modificações nessa porção do LPS podem impactar significativamente no perfil de virulência bacteriana e nas interações com o sistema

imunológico, especialmente o inato. A convergência da resistência à colistina e um ganho ou a conservação da aptidão bacteriana podem representa um desafio duplo para a saúde.

Como perspectiva futura desse estudo espera-se confirmar de formais precisa a influência da mutação pontual no domínio HAMP da proteína CrrB (A91T) no alto grau de resistência da cepa *Citrobacter freundii* C156, assim como a influência na virulência da cepa, como hipotetizamos no presente estudo, utilizando de técnicas de engenharia genética.

11. CONCLUSÕES

- a) A composição do *locus crrAB* presente em *C. freundii* C156 é a mesma observada em quase todos os genomas de Enterobacteriaceae positivos para *crrAB*;
- b) A distribuição do *locus crrAB* é variável e se dá a nível de linhagem na espécie *Citrobacter freundii*, indicando uma aquisição lateral do *locus* por transferência horizontal;
- c) As larvas de *Galleria mellonella* são susceptíveis a infecção por *Citrobacter freundii*, especialmente as cepas de estudo, que se dá de forma dose-dependente e são, portanto, um modelo confiável para o estudo da virulência e patogenicidade dessa espécie bacteriana;
- d) A resistência estável às polimixinas por mutação em TCS's, especialmente CrrAB, em *Citrobacter freundii* pode não causar perda da aptidão bacteriana, podendo apresentar ainda uma vantagem na virulência da cepa.

12. REFERÊNCIAS

- ABBOUD, C. S. *et al.* Post-surgical mediastinitis due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Clinical, epidemiological and survival characteristics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 386–390, 2016. Disponível em:
- ANDERSON, M. T. *et al.* crossm Capsule Production and Glucose Metabolism Dictate Fitness during. [s. l.], v. 8, n. 3, 2017.
- ANDERSON, M. T. *et al.* *Citrobacter freundii* fitness during bloodstream infection. **Scientific Reports (Nature)**, v. 8, p. 11792, 2018.
- ANDERSEN, M. L.; WINTER, L. M. F. Animal models in biological and biomedical research – experimental and ethical concerns. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2019.
- ANDRADE, L. N. Estudo fenotípico e molecular de beta-lactamases de espectro estendido e AmpC em enterobactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite. **Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo**, [s. l.], p. 85, 2008.
- ANDREASEN, M. *et al.* Physical Determinants of Amyloid Assembly in Biofilm Formation. **mBio**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2019.
- ARNDT, D. *et al.* PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic Acids Res**, v. 8, 2016.
- ARAÚJO, G. I. R. De. Análise Genética dos Determinantes de Resistência à Colistina em Isolado Clínico de *Citrobacter* spp. 2018. **Universidade Federal de Pernambuco**, [s. l.], 2018.
- ASPENSTRÖM-FAGERLUND, B. *et al.* Distribution of chloramphenicol to tissues, plasma and urine in pigs after oral intake of low doses. **Food Additives & Contaminants**, 2016.
- BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3380>.
- CAIN, A. K. *et al.* Morphological, genomic and transcriptomic responses of *Klebsiella pneumoniae* to the last-line antibiotic colistin. **Scientific Reports**, 2018.

- CARATTOLI, A. *et al.* *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 7, p.3895-903, 2014.
- CHENG, Y. H. *et al.* Amino acid substitutions of *crrb* responsible for resistance to colistin through *crrc* in *klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 3709–3716, 2016.
- CHENG, Y. H. *et al.* Uma bomba de efluxo do tipo RND putativa, H239_3064, contribui para a resistência à colistina por meio de CrrB em *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 6, p. 1509–1516, 2018.
- CLERMONT, D. *et al.* Multilocus sequence analysis of the genus *citrobacter* and description of *citrobacter pasteurii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 65, n. 5, p. 1486–1490, 2015.
- CORREIA, S. *et al.* Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 5, p. 551–559, 2017.
- CRUZ-MACHADO, S. D. S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFKB. **Revista da Biologia**, [s. l.], v. 4, p. 40–43, 2010.
- D'ANGELO, R. G. *et al.* Treatment options for extended-spectrum betalactamase (ESBL) and AmpC-producing bactéria. **EXPERT OPINION ON PHARMACOTHERAPY**, v. 17, n. 7, p. 953–967, 2016.
- DINOS, P. G. The macrolide antibiotic renaissance. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, p. 2967–2983, 2017.
- DOI, YOHEI, JUN-ICHI WACHINO, Y. A. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S. **Infectious Disease Clinics of NA**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 523–537, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.011>.
- DORMAN, M. J.; FELTWELL, T.; GOULDING, D. A. The Capsule Regulatory Network of *Klebsiella pneumoniae* Defined by density-TraDISort. [s. l.], v. 9, n. 6, p. 1–19, 2018.
- DORTET, L. *et al.* Rapid detection and discrimination of chromosome-And MCR-plasmid-mediated resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS in *Escherichia coli*: The MALDIxin test. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 73, n. 12, p. 3359–3367, 2018.
- DOUROS, A.; GRABOWSKI, K.; STAHLMANN, R. Safety issues and drug–drug interactions with commonly used quinolones. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 25–39, 2014.

- DUIJKEREN, E. Van *et al.* The use of aminoglycosides in animals within the EU : development of resistance in animals and possible impact on human and animal health : a review. [s. l.], 2019.
- DURRANTE, M. G. *et al.* A Bioinformatic Analysis of Integrative Mobile Genetic Elements Highlights Their Role in Bacterial Adaptation. **Cell host & Microbe**, p. 140 – 153, 2020.
- EHMAN, E. C. *et al.* HHS Public Access. [s. l.], v. 46, n. 5, p. 1247–1262, 2017.
- ESPINOZA, R. A. *et al.* Differential roles for pathogenicity islands SPI-13 and SPI-8 in the interaction of *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Typhi* with murine and human macrophages. **Biological Research**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 1–7, 2017.
- ESPOSITO, E. P. *et al.* Molecular Epidemiology and Virulence Profiles of Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Blood Isolates From the Hospital Agency “Ospedale dei Colli,” Naples, Italy. **Front. Microbiol**, 2018.
- EVERMAN, J. L. *et al.* Establishing *Caenorhabditis elegans* as a model for *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* infection and intestinal colonization. **The Company of Biologists Ltd (Biology Open)**, v. 4, p. 1330-1335, 2015.
- FALAGAS, M. E. *et al.* The use of intravenous and aerosolized polymyxins for the treatment of infections in critically ill patients: A review of the recent literature. **Clinical Medicine and Research**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 138–146, 2006.
- FALAGAS, M. E. *et al.* Fosfomycin. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, 2016.
- GUILLARD, T. *et al.* Antibiotic resistance and virulence: Understanding the link and its consequences for prophylaxis and therapy. **BioEssays**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 682–693, 2016.
- HADI RAZAVI NIKOO, A. A.; MARDANEH, And J. Systematic Review of Antimicrobial Resistance of Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates in Iran : [s. l.], v. 00, n. 00, 2017.
- HONG, X.; CHEN, H. D.; GROISMAN, E. A. Gene expression kinetics governs stimulus-specific decoration of the *Salmonella* outer membrane. [s. l.], v. 7921, n. May, p. 1–12, 2018.
- JACOBSEN, S. M. *et al.* Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 26–59, 2008.
- JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Hafnia*: From soup to nuts. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 12–28, 2006.
- JIANG, Y. Risk factors with the development of infection with tigecycline- and carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae*. [s. l.], p. 667–674, 2019.

JORJÃO, A. L. *et al.* From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 383–389, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1397871>.

KAVANAGH, K.; FALLON, J. P. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. **Fungal Biology Reviews**, [s. l.], v. 24, n. 1–2, p. 79–83, 2010.

KO, *et al.* *Citrobacter bitternis* sp. nov. Isolated from Bitterns. **Curr Microbiol**, v. 70, p. 894–897, 2015.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets Brief communication. [s. l.], v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LINGZHI, L. *et al.* The role of two-component regulatory system in β -lactam antibiotics resistance. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 215, n. July, p. 126–129, 2018.

LI, J. *et al.* VRprofile: gene-cluster-detection-based profiling of virulence and antibiotic resistance traits encoded within genome sequences of pathogenic bacteria. **Briefings in Bioinformatics**, v. 19, n. 4, p. 566–574, 2018.

LIU, L. *et al.* Genetic Diversity, Multidrug Resistance, and Virulence of *Citrobacter freundii* From Diarrheal Patients and Healthy Individuals. **Frontier in Microbiology**, v. 8, 2018.

LIU, L. *et al.* *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. **Journal of Microbiology, immunology and infection**, v. 51, p. 565–572, 2017.

MAJEWSKI, P. *et al.* Emergence of a multidrug-resistant *Citrobacter freundii* ST8 harboring an unusual VIM-4 gene cassette in Poland. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 61, p. 70–73, 2017.

MITHARWAL, S. M. *et al.* Intensive care unit-acquired infections in a tertiary care hospital: An epidemiologic survey and influence on patient outcomes. **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 44, n. 7, p. e113–e117, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.01.021>.

MULCAHY *et al.* *Drosophila melanogaster* as an Animal Model for the Study of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections *In Vivo*. **PLoS Pathogens**, v. 7, 2011.

NEWMAN, J. R.; FUQUA, C. Broad-host-range expression vectors that carry the l-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. **Gene**, [s. l.], v. 227, n. 2, p. 197–203, 1999.

NI, W. *et al.* Tigecycline-Amikacin Combination Effectively Suppresses the Selection of Resistance in Clinical Isolates of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. **Frontier in Microbiology**, v. 7, 2016.

NURI, R.; SHPRUNG, T.; SHAI, Y. Defensive remodeling: How bacterial surface properties and biofilm formation promote resistance to antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [s. l.], v. 1848, n. 11, p. 3089–3100, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.05.022>.

OBERTO, J. SyntTax: A web server linking synteny to prokaryotic taxonomy. **BMC Bioinformatics**, v. 14.

O'CALLAGHAN, D.; VERGUNST, A. Non-mammalian animal models to study infectious disease: worms or fly fishing? **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p.79–85, 2010.

OLIVEIRA, S. V. De; LOPES, J. T. S.; BAIROS, S. Surveillance of yellow fever in Cacapava do Sul, Rio Grande: a report on the epizootic of 2008-2009. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 81–86, 2010. Disponível em: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S217662232010000100023&lng=pt&nrm=iso&tlng=es.

OLIVEIRA, H. *et al.* Characterization and genome sequencing of a *Citrobacter freundii* phage CfP1 harboring a lysin active against multidrug-resistant isolates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 100, n. 24, p. 10543–10553, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7858-0>.

PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, M. *et al.* Reversal of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemiology from *bla*KPC - to *bla*VIM -harbouring isolates in a Greek ICU after introduction of ceftazidime / avibactam. [s. l.], p. 13–16, 2019.

PATERSON, D. L. Infections Due to Other Members of the Enterobacteriaceae, Including Management of Multidrug-Resistant Strains. **Twenty Fou ed. [s.l.]: Elsevier Inc.**, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4377-1604-7.00313-4>.

PEREIRA *et al.* Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. **Journal of Fungi**, v. 4, 2018.

PAPP-WALLACE, K. *et al.* Carbapenems: Past, Present, and Future. **MINIREVIEW**, v. 55, n. 11, 2011.

PITIRIGA, V.; DIMITROULIA, E.; SAROGLU, G. Expert Review of Anti-infective Therapy The challenge of curbing aminoglycoside resistance : can antimicrobial stewardship

- programs play a critical role ? **Expert Review of Anti-infective Therapy**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 947–954, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1382355>.
- POIREL, L., JAYOL, A., & NORDMANN, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. [s. l.], v. 30, n. 2, p. 557–596, 2017.
- QADIR, M. A.; AHMED, M. ; IQBAL, M. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activities of Novel Sulfonamides Derived through Condensation of Amino Group Containing Drugs, Amino Acids, and Their Analogs. **BioMed Research International**, 2015.
- QIAN, C. *et al.* Development of rapid and simple experimental and in silico serotyping systems for *Citrobacter*. [s. l.], 2018.
- RAHDAR, M. *et al.* Detection of pap, sfa, afa, foc, and fim adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* isolates collected from patients with urinary tract infection. **Jundishapur Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 8, 2015.
- RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. **JOVE**, 2012.
- RIBEIRO, T. G. *et al.* *Citrobacter europaeus* sp. nov., isolated from water and human faecal samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 170–173, 2017.
- RIBEIRO, T. G. *et al.* *Citrobacter portucalensis* sp. nov., isolated from an aquatic sample. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 67, p. 3513–3517, 2017.
- RIVERS, U. S. *et al.* Carbapenemase-producing. [s. l.], v. 11, n. 2, p. 260–264, 2005.
- ROMNEY M. HUMPHRIES. CIM City: The game continues for a better carbapenemase test. [s. l.], n. April, 2019.
- RONDINI, S. *et al.* Characterization of *Citrobacter* sp. line 328 as source of Vi for Vi-CRM197 glycoconjugate vaccine against *Salmonella Typhi*. **J Infect Dev Ctries**, v. 11, n. 6, p. 763-773, 2012.
- SANTOS, G. S. *et al.* Study of the Enterobacteriaceae Group CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella* and *Hafnia*): A Review. **The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs**, [s. l.], p. 794–805, 2015.

SAMSONOVA, J. V.; CANNAVAN, A.; ELLIOTT C. T. A Critical Review of Screening Methods for the Detection of Chloramphenicol, Thiamphenicol, and Florfenicol Residues in Foodstuffs. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.42, p.50andē–78, 2012.

SANDERS, C. M. *et al.* *Citrobacter rodentium*–host– microbiota interactions: immunity, bioenergetics and metabolism. **Nature Review (Microbiology)**, v. 17, 2019.

SCHROEDER, M.; BROOKS, B. D.; BROOKS, A. E. The complex relationship between virulence and antibiotic resistance. **Genes**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2017.

SCHWARZ, S.; LOEFFLER, A.; KADLEC, K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. [s. l.], n. Mic, 2017.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. **Bio/Technology**, [s. l.], v. 1, n. 9, p. 784–791, 1983.

TRIMBLE, M. J. *et al.* Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. a025288, 2016.

TIETGEN, M. *et al.* Impact of the colistin resistance gene *mcr-1* on bacterial fitness. **Int J Antimicrob Agents**, v. 51, n. 4, p. 554-561, 2018.

VERMA, V. *et al.* Efficient production of endotoxin depleted bioactive α -hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, p. 1 -7, 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10826068.2019.1591993>.

VIEGAS, S. C. *et al.* The virulence of *Salmonella enterica serovar typhimurium* in the insect model *Galleria mellonella* is impaired by mutations in RNase E and RNase III. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 79, n. 19, p. 6124–6133, 2013.

WAND, M. E.; SUTTON, J. M. Mutations in the two component regulator systems PmrAB and PhoPQ give rise to increased colistin resistance in *Citrobacter* and *Enterobacter* spp. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, 2020.

WAND, M. E.; BOCK, L. J.; SUTTON, J. M. Retention of virulence following colistin adaptation in *Klebsiella pneumoniae* is strain-dependent rather than associated with specific mutations. **J Med Microbiol.** v.66, n. 7, p. 959-964, 2017.

WANG, C. *et al.* Epidemiologic analysis and control strategy of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care units in a teaching hospital of People's Republic of China. **Infection and Drug Resistance**, [s. l.], v. 12, p. 391–398, 2019.

WANG, X. *et al.* Emergence of the colistin resistance gene *mcr-1* and its variant in several uncommon species of Enterobacteriaceae from commercial poultry farm surrounding environments. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 219, n. 2010, p. 161–164, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.002>.

WRIGHT, M. S. *et al.* Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 536–543, 2015.

WU, G. *et al.* Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. **Elsevier**, v. 48, p. 297–304, 2016.

Yuan, C. *et al.* Comparative genomic analyses of *Citrobacter* and key genes essential for the pathogenicity of *Citrobacter koseri*. **Frontier in Microbiology**, v. 10, 2019.

ZHANG, R. *et al.* High-level carbapenem resistance in a *Citrobacter freundii* clinical isolate is due to a combination of KPC-2 production and decreased porin expression. [s. l.], p. 332–337, 2008.

ZHOUG, G. *et al.* Complete genome sequence of *Citrobacter werkmanii* strain BF-6 isolated from industrial putrefaction. **BMG Genomics**, p. 18:795, 2017.

