

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Cepas de *Enterobacter hormaechei* produtoras de NDM-1: análise de antibacterianos *in vitro* e em *Galleria mellonella* e mecanismos de adesão envolvidos na formação de biofilme

FLÁVIA ROBERTA BRUST

PORTO ALEGRE, 2017

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

Cepas de *Enterobacter hormaechei* produtoras de NDM-1: análise de antibacterianos *in vitro* e em *Galleria mellonella* e mecanismos de adesão envolvidos na formação de biofilme

Tese apresentada por **Flávia Roberta Brust** para a obtenção de TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Porto Alegre, 2017

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25.08.2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dr. Gertrudes Corção

Universidade Federal do Rio do Sul

Profa. Dr. Maria Helena da Silva Pitombeira Rigatto

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Brust, Flávia Roberta
Cepas de *Enterobacter hormaechei* produtoras de
NDM-1: análise de antibacterianos *in vitro* e em
Galleria mellonella e mecanismos de adesão envolvidos
na formação de biofilme / Flávia Roberta Brust. --
2017.
116 f.
Orientador: Alexandre José Macedo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2017.

1. *Enterobacter* spp. . 2. Biofilme. 3. Fímbrias. 4.
blaNDM-1. I. Macedo, Alexandre José, orient. II.
Título.

Agradecimentos à CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho; ao Laboratório de Tecnologia Bioquímica da Faculdade de Farmácia, ao Laboratório de Peptidases e Enzimas Proteolíticas do Centro de Biotecnologia desta Universidade, bem como ao Departamento de Microbiologia e Controle de Infecção do SSI (Staten Serum Institute) em Copenhagen que disponibilizaram os equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos na elaboração da presente tese.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador, prof. Dr. Alexandre José Macedo, pela oportunidade, confiança e ensinamentos. Muito obrigada por toda ajuda e incentivo durante estes quatro anos, pelos infinitos conselhos e por sempre acreditar em mim.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de fazer doutorado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Prof^ª. Dr. Tiana Tasca e aos amigos do Laboratório de Parasitologia pela amizade, carinho e convivência ao longo destes quatro anos.

À Karen Krogfelt pela amizade e confiança e, por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório. Aos demais integrantes e amigos do *Bacteria, Parasites and Fungi* pelo carinho e hospitalidade e ao *Staten Serum Institute* em Copenhague por disponibilizar a estrutura e suporte necessários para realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Termignoni por permitir o acesso ao Laboratório de Peptidases e Enzimas Proteolíticas do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, Anelise Baptista, Danielle Trentin, Júlia Zilles, Luana Boff, Luciana Loges, Nicole Sartori, Rodrigo Campos e Sharon Reis pela amizade, companheirismo, conversas e risadas. Também agradeço àqueles que não estão mais no laboratório, mas que também fizeram parte deste período da minha vida.

Aos meus queridos amigos, pelo incentivo, pelo companheirismo, pelas palavras de apoio, incentivo e pelos momentos de descontração. Um agradecimento especial às amigas Marina Xavier, Larissa Penna e Bárbara Netto.

Às amigas do vôlei pela amizade, carinho, apoio, momentos de descontração e, principalmente, por me mostrarem que existem mais coisas no mundo além de bactérias, mecanismos de virulência e antibacterianos.

Aos amores da minha vida, meus pais. Não tenho palavras para expressar toda gratidão e amor que sinto por vocês. Obrigada de coração pelo amor incondicional, pelo carinho e incentivo, pela confiança e por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim. Por nunca terem medido esforços para investir na minha educação.

Ao meu irmão e minha cunhada pelos exemplos pessoais e profissionais que representam para mim. Por todo amor, carinho e incentivo que sempre me deram.

Ao meu sobrinho Pedro, o amorzinho da dinda. Por ter tornado o mundo melhor e por toda alegria que nos proporciona.

Obrigada a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste sonho.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.”

Nelson Mandela

LISTA DE ABREVIATURAS

ANI: *Average Nucleotide Identify*

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CEC: complexo *Enterobacter cloacae*

c-di-GMP: monofosfato de guanosina dimérico cíclico

hsp60: *heat shock protein gene*

EPS: matriz exopolissacarídica

ERC: enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos

ESBLs: beta lactamases de espectro estendido

GGDC - *Genome-to-Genome Distance Calculator*

IABs: infecções associadas a biofilme

MIC: concentração inibitória mínima

NIH: *National Institute of Health*

NDM-1: New Delhi metallo- β -lactamase

PCR: *polymerase chain reaction*

SNP: *single-nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único)

RESUMO

A emergência de cepas de produtoras de carbapenemases é uma realidade em vários países, incluindo o Brasil. Estudos anteriores mostraram a habilidade de cepas do complexo *Enterobacter cloacae* em adquirirem o gene *bla_{NDM-1}* (New Delhi metalo β -lactamase). Devido à importância clínica deste gênero o objetivo do presente trabalho foi investigar fatores de virulência envolvidos no processo de adesão e na formação de biofilme em cepas de *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* produtoras de NDM-1. O modelo de biofilme em macrocolônia foi utilizado para avaliar a suscetibilidade e a formação de biofilme das diferentes subpopulações geradas pela macrocolônia. *In vitro*, o perfil de suscetibilidade e a avaliação do sinergismo entre os antibacterianos (meropenem, rifampicina e polimixina B) foram determinados pelos métodos de concentração inibitória mínima (MIC) e checkerboard, respectivamente. Larvas de *Galleria mellonella* foram utilizadas para verificar a eficácia da terapia antibacteriana *in vivo*. A detecção de genes fimbriais foi feita pela técnica de PCR e a expressão das fímbrias tipo 1 e tipo 3 foi determinada por ensaios de aglutinação com diferentes eritrócitos na presença de manose. Para os experimentos de adesão celular, células epiteliais de bexiga (ATCC® 5637) foram infectadas com bactérias e a contagem de unidades formadoras de colônia foi determinada. Por fim, a construção de mutantes para as fímbrias foi realizada por troca alélica e o sequenciamento do DNA bacteriano foi feito em plataforma Illumina. As quatro subpopulações originadas da macrocolônia 798F (denominadas de 798-1S, 798-2S, 798-3S e 798-4S) apresentaram diferenças na formação de biofilme e na resposta ao tratamento com antibacterianos. Somente as subpopulações que produziam a fimbria tipo 3 (798-1S e 798-2S) foram capazes de formar biofilme, mostrando a importância desta fimbria na formação de biofilme de cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae*. As duas subpopulações (798-1S e 798-4S) avaliadas *in vivo* mostraram diferentes respostas à terapia com antibacterianos. Em uma das subpopulações (798-4S) a terapia tripla com meropenem, rifampicina e polimixina B e a monoterapia com meropenem foram capazes de aumentar a sobrevivência das larvas, entretanto, nenhum dos tratamentos testados mostrou efeito nas larvas infectadas

com 798-1S. Outro achado interessante foi a discrepância encontrada entre os resultados de suscetibilidade aos antibacterianos *in vitro* e *in vivo*. A polimixina B não foi capaz de aumentar a sobrevivência das larvas embora as subpopulações fossem suscetíveis *in vitro*. Apesar do efeito sinérgico da combinação tripla *in vitro*, ela só teve efeito contra 798-4S *in vivo*. Por outro lado, o tratamento com meropenem foi capaz de aumentar a sobrevivência das larvas inoculadas com 798-4S apesar da resistência *in vitro*. Devido à importância das fímbrias no processo de adesão bacteriana e na formação do biofilme, o papel desses fatores de virulência foi avaliado. De acordo com o ensaio de aglutinação aos eritrócitos, nove isolados de *E. hormaechei* subsp. *oharae* expressavam a fímbria tipo 1 e, apenas dois (798F e 977F) expressavam a fímbria tipo 3. As cepas mutantes para fímbria tipo 1 (997F Δ *fim*) e para a fímbria tipo 3 (798F Δ *mrk*) não foram capazes de formar biofilme em placa de poliestireno provando que ambas desempenham um papel fundamental na formação do biofilme. Entretanto, estas cepas mutantes não apresentaram diferenças na adesão às células epiteliais da bexiga quando comparadas às cepas selvagens. Importante ressaltar que as cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae* mostraram uma alta capacidade de adesão celular. O resultado do sequenciamento do DNA dos isolados 7F, 798F e 997F, juntamente com a análise do perfil dos plasmídeos, sugerem que o operon *mrkABCDF*, responsável pela codificação da fímbria tipo 3, esteja localizado em um plasmídeo. Com os resultados deste estudo podemos concluir que (i) macrocolônias de *E. hormaechei* subsp. *oharae* são capazes de gerar subpopulações com diferenças relacionadas à virulência e à resposta ao tratamento; (ii) os métodos utilizados para determinação da suscetibilidade *in vitro* apresentam limitações podendo levar à falha terapêutica; (iii) as fímbrias tipo 1 e tipo 3 são fundamentais para a formação de biofilme em placa de poliestireno; (iv) a habilidade em adquirir plasmídeos que codificam genes de virulência e/ou de resistência a antibacterianos confere benefícios ao gênero *Enterobacter* o que pode justificar sua alta prevalência em infecções bacterianas.

Palavras-chaves: *Enterobacter* spp., mecanismos de virulência, adesão, fímbrias, biofilme, macrocolônias, gene *bla*_{NDM-1}.

ABSTRACT

NDM-1 producing *Enterobacter hormaechei* strains: *in vitro* and *in vivo* analysis of antimicrobial agents and adhesion mechanisms involved in biofilm formation

Emergence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae represents a concern in many countries, including Brazil. Previous studies have shown that members of the *Enterobacter cloacae* complex are able to acquire resistance genes as *bla*_{NDM-1} (New Delhi metallo β -lactamase). Considering the clinical relevance of this genus the aim of this study was to evaluate virulence mechanisms involved in bacterial adhesion and biofilm formation of NDM-1 producing *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* strains. Macrocolony model was used to evaluate susceptibility profile and ability to form biofilm in different subpopulations generated by the macrocolony. *In vitro*, antimicrobial susceptibility and synergistic effect of meropenem, rifampicin and polymyxin B alone or combined were determined by minimum inhibitory concentration and checkerboard, respectively. *Galleria mellonella* model was used to evaluate antimicrobial therapy efficacy *in vivo*. Fimbrial genes were investigated by PCR and type 1 and type 3 fimbriae expression was determined by specific agglutination of red blood cells from different animal species with mannose. Cell adhesion assay was performed with human bladder cancer-derived epithelial cell line ATCC® 5637 infected with bacteria and the number of colony forming units was calculated. Finally, fimbriae mutants were constructed by allelic exchange and whole-genome sequencing was performed using Illumina equipment. The four subpopulations generated from 798F macrocolony, termed as 798-1S, 798-2S, 798-3S e 798-4S, showed differences regarding biofilm formation and response to antimicrobial therapy. Only subpopulation expressing type 3 fimbriae (798-1S and 798-2S) were able to form biofilm, highlighting the importance of these fimbriae in biofilm formation of *E. hormaechei* subsp. *oharae* strains. Two subpopulations (798-1S e 798-4S) were evaluated in *G. mellonella* model and showed different antimicrobial therapy results. In 798-4S, triple therapy with meropenem, rifampicin and polymyxin B and meropenem alone were able to increase larvae survival; none of the treatment was effective against larvae infected with 798-1S.

We also observed discrepancies between *in vivo* and *in vitro* antimicrobial susceptibility. Polymyxin B did not enhance larvae survival despite susceptible profile *in vitro*. Triple combination presented synergistic effect *in vitro* against 798-1S and 798-4S but, this treatment was not able to enhance survival rates in larvae infected with 798-1S. On the other hand, monotherapy with meropenem was able to increase the survival of larvae infected with 798-4S besides *in vitro* resistance. Because fimbriae are involved in bacterial adhesion to biotic and abiotic surfaces and are also important for biofilm formation we decided to study the role of these virulence mechanisms in *E. hormaechei* subsp. *oharae* strains. According, hemagglutination results, the nine clinical isolates evaluated expressed type 1 fimbriae whereas only two isolates (798F e 997F) expressed type 3 fimbriae. Type 1 fimbriae mutant (997F Δ *fim*) and type 3 fimbriae mutant (798F Δ *mrk*) did not produce biofilm in 96 well polystyrene plate proving that these fimbriae are essential for biofilm formation. However, the mutant strains did not show differences on adhesion to bladder epithelial cells comparing with wild type strains. It is important to highlight that *E. hormaechei* subsp. *oharae* strains showed a high ability to adhere to these cells. Genome sequencing and plasmid profile of 7F, 798F and 997F isolates suggest that type 3 fimbriae operon *mrk*ABCDF is located on a plasmid. Taken together, these results indicate that (i) *E. hormaechei* subsp. *oharae* macrocolonies were able to generate subpopulations with distinct virulence and response to antimicrobial therapy characteristics; (ii) *in vitro* antimicrobial susceptibility testing methods showed limitations and may lead to therapeutic failure; (iii) type 1 and type 3 fimbriae are essential for biofilm formation in polystyrene plate; (iv) the ability to acquire plasmids encoding virulence and antimicrobial resistant genes confers benefits to *Enterobacter* genus and may explains its high prevalence in bacterial infection.

Keywords: *Enterobacter* spp., virulence mechanisms, adhesion, fimbrias, biofilm, macrocolonies, *bla*_{NDM-1} gene.

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO	19
II - REVISÃO DO TEMA	23
II - 1. Enterobacteriaceae	25
II - 2. Complexo <i>Enterobacter cloacae</i>	25
II - 2.1 <i>Enterobacter hormaechei</i>	28
II - 2.2 Epidemiologia	28
II - 3. Fatores de virulência	29
II - 3. 1 Biofilme.....	31
II - 3. 2 Adesinas fimbriais.....	39
II - 4. Resistência bacteriana	43
II - 4.1 NDM (New Delhi metalo- β -lactamases).....	44
II- 5. <i>Galleria mellonella</i> - modelo <i>in vivo</i>	47
III - OBJETIVOS	51
III - 1. Objetivo geral	53
III - 2. Objetivos específicos	53
IV - CAPÍTULOS	55
IV - CAPÍTULO 1 - Macrocolony of NDM-1 Producing <i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i> Generates Subpopulations with Different Features Regarding the Response of Antimicrobial Agents and Biofilm Formation.....	57
IV - CAPÍTULO 2 - Identification of type 1 and type 3 fimbriae of <i>Enterobacter hormaechei</i> clinical isolates.....	77
V- DISCUSSÃO GERAL	95
VI - CONCLUSÕES	103
VII - REFERÊNCIAS	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alguns mecanismos de virulência encontrados na família Enterobacteriaceae. Adaptado de LUTHJE <i>et al.</i> (2014).....	30
Figura 2. Etapas da formação de biofilme. Adaptado de KOSTAKIOTI <i>et al.</i> (2013).....	32
Figura 3. Modelos de biofilme. Representação esquemática de três tipos de biofilme encontrados na natureza, na indústria e na área médica. Adaptado de SERRA e HENGGE (2014).	37
Figura 4. Morfotipos de colônias de <i>Salmonella typhimurium</i> crescidas em ágar contendo Congo Red após 48 h a 26 °C. Adaptado de BARNHART e CHAPMAN (2006).	38
Figura 5. A) Estrutura de pili tipo P (<i>pap</i>) e B) fímbria tipo 1 (<i>fim</i>). As subunidades estão representadas por diferentes cores. Os números indicam o numero de cópias de cada subunidade. As adesinas (verde) são responsáveis pela adesão às células do hospedeiro; proteínas <i>chaperones</i> (amarelo) estão ligadas a última subunidade de cada fímbria; as proteínas <i>usher</i> (roxo e azul) formam um poro na membrana externa (ME). A subunidade terminal no pili tipo P na ME é PapH (cinza), esta subunidade não é conhecida no sistema Fim. Fonte: BUSCH e WAKSMAN (2012).....	40
Figura 6. Micrografia eletrônica da fímbria tipo 1. A célula bacteriana possui de 100 a 500 fímbrias distribuídas na sua superfície, cada uma com 7 nm de largura e 0,2 a 2 µm de comprimento. Fonte: KLEMM e SCHEMBRI (2004).	41
Figura 7. Estrutura da fímbria de curli. ME: membrana externa. Fonte: FRONZES <i>et al.</i> (2008).	43
Figura 8. Estágios do inseto <i>Galleria mellonella</i> . Fonte: RAMARAO <i>et al.</i> (2012).....	48

I - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse pelo gênero *Enterobacter* vem aumentando devido a sua crescente importância como patógeno nosocomial. Embora este gênero seja composto por mais de trinta espécies, somente membros do complexo *Enterobacter cloacae* (CEC) possuem relevância clínica. A identificação de espécies e subespécies do CEC é complexa e sofre alterações constantemente. Este complexo é composto por seis espécies nomeadas (*Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei* e *Enterobacter nimipressuralis*) e por diferentes *clusters* que foram agrupados devido à alta similaridade genética e fenotípica que apresentam (HOFFMANN e ROGGENKAMP, 2003; CHAVDA *et al.*, 2016). Dentre os membros do CEC, *E. hormaechei* é o mais frequentemente isolado em amostras clínicas. Cabe ressaltar que as metodologias utilizadas em laboratórios de microbiologia clínica não são capazes de diferenciar estas espécies e subespécies devido à similaridade entre elas (MEZZATESTA *et al.*, 2012; CHAVDA *et al.*, 2016).

A importância do CEC como patógeno nosocomial deve-se principalmente à sua habilidade em adquirir mecanismos de resistência como carbapenemases (CHAVDA *et al.*, 2016). Atualmente, uma das carbapenemases mais frequentemente isoladas é NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase) descrita em 2009 (YONG *et al.*, 2009). Embora mundialmente esta enzima seja mais comumente encontrada em cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, no Rio Grande do Sul ela parece estar mais relacionada a cepas de CEC (ROZALES *et al.*, 2014). Apesar da importância clínica do CEC, fatores relacionados à sua virulência ainda são pouco conhecidos (SANDERS e SANDERS, 1997; KREMER e HOFFMANN, 2012b; MEZZATESTA *et al.*, 2012).

Virulência é a habilidade do patógeno em causar doença e, fatores ou mecanismos de virulência são os determinantes responsáveis pelos danos ao hospedeiro (CLATWORTHY *et al.*, 2007; BECEIRO *et al.*, 2013). As adesinas fimbriais são fatores de virulência cruciais em bactérias gram negativas, pois são responsáveis pelo processo de adesão, uma etapa fundamental na patogênese bacteriana que antecede a colonização e infecção. Estes apêndices extracelulares também estão envolvidos na invasão celular e na formação de biofilme (GIRARD e MOUREZ, 2006; ALLEN *et al.*, 2012).

O biofilme representa outro importante fator de virulência aos micro-organismos. Esta forma de crescimento confere diversas vantagens para as bactérias como a capacidade de evasão do sistema imune do hospedeiro e a tolerância aos antibacterianos (DONLAN e COSTERTON, 2002). O interesse pelas infecções associadas ao biofilme tem aumentado significativamente nos últimos anos uma vez que elas representam mais de 80% das infecções bacterianas (BJARNSHOLT *et al.*, 2013). Para agravar esta situação, muitas vezes a terapia utilizada é incapaz de erradicar o biofilme resultando em uma infecção crônica ou na necessidade de remoção cirúrgica do dispositivo ou prótese médica (DAVIES, 2003)

O tratamento de infecções associadas a biofilme e de infecções causadas por bactérias multirresistentes representa um desafio na clínica e evidencia a necessidade de novos agentes e novas terapias antibacterianas. A pesquisa de terapias antivirulência capazes de inibir ou bloquear fatores de virulência parece ser uma alternativa promissora no combate destas infecções bacterianas.

O presente estudo teve como objetivo obter informações referentes aos mecanismos de adesão e à formação de biofilme de isolados clínicos de *E. hormaechei* produtoras de NDM-1. O estudo desses mecanismos de virulência visa entender melhor o processo de patogênese bacteriana bem como proporcionar ferramentas para uma possível terapia antivirulência.

II - REVISÃO DO TEMA

II - 1. Enterobacteriaceae

A família Enterobacteriaceae é composta por 53 gêneros e mais de 170 espécies já foram nomeadas; 26 gêneros são conhecidos por causarem infecções em humanos, como: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* entre outros. Os membros da família Enterobacteriaceae são bacilos gram negativos não esporulados, oxidase negativa, anaeróbios facultativos, crescem bem a 37 ° C e a maioria dos gêneros possui flagelos os quais são responsáveis pela motilidade (**Identification of Enterobacteriaceae**, 2015).

A taxonomia das enterobactérias vem passando por constantes alterações devido ao desenvolvimento e aprimoramento de métodos moleculares utilizados para a identificação e diferenciação de espécies e gêneros desta família. Antes da era molecular, a nomenclatura destes bacilos gram negativos era baseada em características bioquímicas e antigênicas. O emprego de tecnologias como a hibridação de DNA-DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA resultaram em diversas mudanças na classificação desta família, novos gêneros e espécies foram descobertos e muitas espécies foram reclassificadas em outros gêneros. Mais recentemente, estes dois métodos têm sido substituídos por métodos *in silico*, como a identidade média de nucleotídeos (*Average Nucleotide Identify* - ANI) (KONSTANTINIDIS e TIEDJE, 2005) e o cálculo da distância entre genomas (*Genome-to-Genome Distance Calculator* - GGDC) (MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2013).

II - 2. Complexo *Enterobacter cloacae*

O gênero *Enterobacter* foi primeiramente descrito por Hormaeche e Edwards em 1960 (HORMAECHE e EDWARDS, 1960); atualmente, este gênero é composto por 36 espécies (<http://www.bacterio.net/enterobacter.html>). Estes bacilos gram negativos possuem flagelos peritríquios, fermentam a glicose produzindo ácido e gás e algumas cepas possuem cápsula. Crescem rapidamente em meios de cultura habituais e suas colônias são levemente mucoides. O gênero *Enterobacter* possuiu características

semelhantes ao gênero *Klebsiella*, mas pode ser diferenciado pela motilidade e orinitina positivas. As espécies de *Enterobacter* assim como as outras enterobactérias são amplamente distribuídas na natureza podendo ser encontradas no solo, água e intestino de animais e humanos (MEZZATESTA *et al.*, 2012).

As principais espécies de relevância clínica do gênero *Enterobacter* constituem o complexo *Enterobacter cloacae* (CEC) composto por *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei* e *Enterobacter nimipressuralis*. Estas seis espécies foram agrupadas, pois possuem uma grande similaridade fenotípica e genética (MEZZATESTA *et al.*, 2012)

Além das espécies citadas acima, pelo menos mais seis genovares constituem este complexo. Hoffmann e Roggenkamp analisaram o sequenciamento parcial do gene *hsp60* (*heat shock proteins*) de 220 cepas (isolados clínicos e cepas de referência) do CEC. Estas cepas foram classificadas em doze *clusters* genéticos: *cluster* I (*E. asburiae*), *cluster* II (*E. kobei*), *cluster* III, *cluster* IV, *cluster* V, *cluster* VI, *cluster* VII (*E. hormaechei*), *cluster* VIII, *cluster* IX, *cluster* X (*E. nimipressuralis*), *cluster* XI (*E. cloacae*) e *cluster* XII (*E. dissolvens*). Mais de dois terços das cepas analisadas pertenciam aos *clusters* III (58 cepas), VI (28 cepas) e VIII (59 cepas) (HOFFMANN e ROGGENKAMP, 2003).

Após a classificação inicial do CEC, algumas alterações foram propostas. Hoffmann *et al.* deram continuidade à caracterização dos *clusters* VI, VII e VIII e concluíram que estes correspondem a subespécies da espécie do *cluster* VII a qual passou a ser denominada como *E. hormaechei* subsp. *hormaechei*; o *cluster* VI foi denominado como *E. hormaechei* subsp. *oharae* e *cluster* VIII como *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (HOFFMANN *et al.*, 2005b).

Além disso, a análise da hibridização DNA-DNA mostrou que *E. cloacae* e *E. dissolvens* pertencem a mesma espécie e por isso foram reclassificadas como *E. cloacae* subsp. *cloacae* e *E. cloacae* subsp. *dissolvens*, respectivamente (HOFFMANN *et al.*, 2005a). Por fim, o *cluster* V foi caracterizado e denominado como *E. ludwigii* (HOFFMANN *et al.*, 2005c).

Recentemente, um estudo realizado por Chavda et al. analisou 447 genomas do CEC utilizando os métodos ANI e polimorfismo de nucleotídeo único (*Single-Nucleotide Polymorphism* - SNP). Estes genomas foram classificados em 18 (A-R) *clusters* (CHAVDA et al., 2016), incluindo os 12 citados anteriormente, a espécie *Enterobacter mori* (ZHU et al., 2011), descrita como patogênica em plantas, e cinco novos *clusters*. A tabela 1 mostra estes *clusters* (A-R) e as respectivas cepas de referência.

Tabela 1. Taxonomia do Complexo *Enterobacter cloacae*.

Grupo (Chavda)	Cluster (Hoffman)	Espécie ou subespécie	Cepa referência
A	VI	<i>E. xiangfangensis</i>	LMG 27195
B	VIII	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	DSM 16691
C	VI	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>	DSM 16687
D	III	<i>E. hormaechei</i>	DSM 14563
E	VII	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hormaechei</i>	ATCC 49162
F		<i>E. mori</i>	LMG 25706
G	XI	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	ATCC 13047
H	XII	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	ND
I	V	<i>E. ludwigii</i>	EN-119
J	I	<i>E. asburiae</i>	ATCC 35953
K		<i>E. cloacae</i> complex	ND
L		<i>E. cloacae</i> complex	ND
M	IV	<i>E. cloacae</i> complex	DSM 16690
N		<i>E. cloacae</i> complex	ND
O		<i>E. cloacae</i> complex	ND
P		<i>E. cloacae</i> complex	ND
Q	II	<i>E. kobei</i>	DSM 13645
R	IX	<i>E. cloacae</i> complex	ND

ND: não descrita. Adaptado de CHAVDA et al. (2016).

Curiosamente, o estudo apontou que o *cluster* III representa uma nova subespécie de *E. hormaechei* e, a espécie *E. xiangfangensis*, descrita recentemente por Gu et al. (GU et al., 2014), também é uma subespécie de *E. hormaechei* (CHAVDA et al., 2016). A identificação de membros do CEC representa um desafio e vem sendo continuamente alterada pelo surgimento de novos métodos de tipagem molecular.

II - 2.1 *Enterobacter hormaechei*

O nome *E. hormaechei* foi empregado pela primeira vez em 1989 para uma espécie até então denominada grupo entérico 75 (O'HARA *et al.*, 1989). Dentre as espécies do CEC, esta é a espécie mais frequentemente isolada em amostras clínicas (HOFFMANN *et al.*, 2005b; OHAD *et al.*, 2014; CHAVDA *et al.*, 2016).

Em um estudo foram analisados 196 isolados do CEC de diferentes sítios anatômicos, 41% destes pertenciam a uma das três subespécies de *E. hormaechei* (9% *E. hormaechei* subsp. *oharae*, 1% *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* e 31% *E. hormaechei* subsp. *steigerwallti*). O segundo *cluster* mais frequente foi o III com 25% dos isolados (KREMER e HOFFMANN, 2012a), de acordo com resultados recentes este *cluster* representa uma nova subespécie de *E. hormaechei*. A análise dos genomas (447) feita por Chavda *et al.* corrobora com os resultados previamente citados. Cepas dos *clusters* VII (*E. hormaechei* subsp. *oharae*) e VIII (*E. hormaechei* subsp. *steigerwallti*) foram as mais frequentemente identificadas com 104 e 83 genomas, respectivamente (CHAVDA *et al.*, 2016).

As cepas de *E. hormaechei* possuem uma alta capacidade de disseminação e, provavelmente, uma virulência maior do que outros membros do CEC. Outro agravante é a habilidade desta espécie em desenvolver resistência a agentes antibacterianos de amplo espectro (PAAUW *et al.*, 2008; ANNAVAJHALA *et al.*, 2019) assunto que será abordado mais adiante.

II - 2.2 Epidemiologia

Enterobacter spp. representa o sexto gênero mais comumente isolado em infecções bacterianas associadas aos cuidados de saúde (PELEG e HOOPER, 2010; PROBERT *et al.*, 2014), correspondendo a, aproximadamente, 5% destas infecções (SIEVERT *et al.*, 2013). A maioria das infecções causadas pelo CEC é de origem nosocomial. Pacientes hospitalizados por longos períodos, com doenças de base e uso prévio de antibacterianos estão mais propensos a desenvolver infecções por estes microorganismos. Além disso, a presença de dispositivos médicos como cateter venoso central, tubo endotraqueal, cateter urinário e próteses também favorece o

desenvolvimento destas infecções. Dentre as manifestações clínicas mais frequentes estão bacteremia, infecções de ossos e tecidos moles, infecções do trato respiratório e urinário, infecções de sistema nervoso central entre outras (SANDERS e SANDERS, 1997).

As infecções causadas por *Enterobacter* spp podem ser de origem endógena ou exógena. As infecções nosocomiais, geralmente, têm origem endógena a partir de um sítio previamente colonizado do paciente, geralmente o trato gastrointestinal. A combinação da debilidade severa e dos efeitos supressivos dos antibacterianos sobre a microbiota do paciente favorece a colonização que, geralmente, precede a infecção (SANDERS e SANDERS, 1997).

II - 3. Fatores de virulência

Para um patógeno causar doença ele precisa superar uma série de condições adversas no hospedeiro tais como pH, temperatura e o sistema imunológico que auxiliam na prevenção da colonização bacteriana. Além disso, a microbiota bacteriana do hospedeiro presente em diversos órgãos deve ser removida ou explorada para a infecção ter sucesso. As bactérias patogênicas utilizam diversas estratégias para superar estas condições adversas e causar doença no hospedeiro (RASKO e SPERANDIO, 2010).

A habilidade de um patógeno causar doença é denominada virulência e fatores de virulência são mecanismos desenvolvidos pelas bactérias capazes de causar danos ao hospedeiro (CLATWORTHY *et al.*, 2007). De uma forma simplificada podemos classificar os fatores de virulência em quatro grupos (figura 1):

- Adesinas: A adesão é uma etapa fundamental na patogênese bacteriana. Na maioria dos casos, o processo de adesão ocorre através de interações específicas entre ligante e receptor; o receptor está localizado na superfície da célula ou tecido e o ligante na superfície da bactéria. O ligante, uma proteína bacteriana específica denominada de adesina, pode adotar várias estruturas que podem ser

dividas em dois grupos: adesinas fimbriais e adesinas afimbriais (GIRARD e MOUREZ, 2006).

- Toxinas: As toxinas auxiliam na disseminação do patógeno em tecidos mais profundos do hospedeiro possibilitando o acesso aos nutrientes intracelulares e a destruição das células do sistema imune (LUTHJE e BRAUNER, 2014).
- Aquisição de ferro: A disponibilidade de ferro no hospedeiro é limitada, por isso as bactérias desenvolveram sistemas para sobreviver à limitação deste metal no ambiente. Estes micro-organismos produzem proteínas denominadas sideróforos responsáveis pela aquisição de ferro do hospedeiro (LUTHJE e BRAUNER, 2014).
- Evasão do sistema imune: Após a infecção, o hospedeiro desencadeia uma forte resposta inflamatória seguida do recrutamento de neutrófilos e da eliminação bacteriana. Alguns micro-organismos têm a capacidade de burlar o sistema imunológico evitando o seu reconhecimento. Uma das principais estratégias adotadas pelas bactérias para a evasão do sistema imune é a formação de biofilmes (LUTHJE e BRAUNER, 2014).

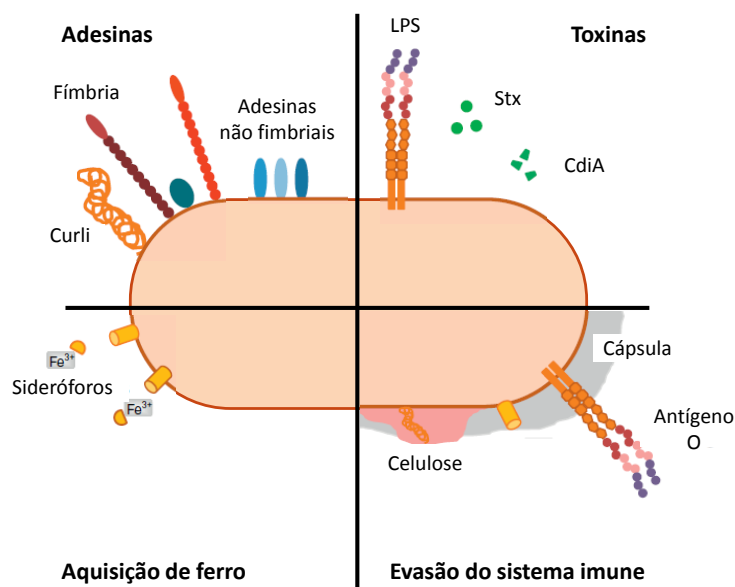


Figura 1. Alguns mecanismos de virulência encontrados na família Enterobacteriaceae. Adaptado de LUTHJE *et al.* (2014).

II - 3. 1 Biofilme

Na natureza, estima-se que pelo menos 90% das bactérias vivam aderidas a superfícies formando comunidades sésseis denominadas biofilme (COSTERTON *et al.*, 1999). Os biofilmes também são encontrados na área médica onde causam sérios problemas à saúde. Muitas infecções bacterianas persistentes e crônicas, como periodontite, otite, infecções biliares e endocardite, estão relacionadas com a formação de biofilme em diferentes células ou tecidos. Além disso, os dispositivos médicos também são propícios à colonização bacteriana e à formação de biofilmes o que os torna fonte de infecções recorrentes (DONLAN e COSTERTON, 2002).

Biofilmes bacterianos são comunidades bem estruturadas envoltas por uma matriz polimérica e aderidas a uma superfície que pode ser biótica ou abiótica (COSTERTON *et al.*, 1999). O crescimento em biofilme confere diversos benefícios para a bactéria como a capacidade de evadir o sistema imune do hospedeiro, a proteção contra protozoários e fagos e o aumento da resistência aos antibacterianos e biocidas (DONLAN e COSTERTON, 2002).

A formação do biofilme pode ser dividida em diferentes etapas (figura 2): (1) adesão inicial da bactéria à superfície, processo reversível: após o processo de adesão, se a bactéria estiver aderida a uma célula eucariótica pode ocorrer a invasão celular, ou então, pode seguir a via que leva a formação de biofilme (STOODLEY *et al.*, 2002; BARNHART e CHAPMAN, 2006); (2) adesão irreversível com produção de matriz exopolissacarídica; (3) desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme (formação de microcolônias), (4) biofilme maduro e, (5) dispersão de bactérias do biofilme (STOODLEY *et al.*, 2002).

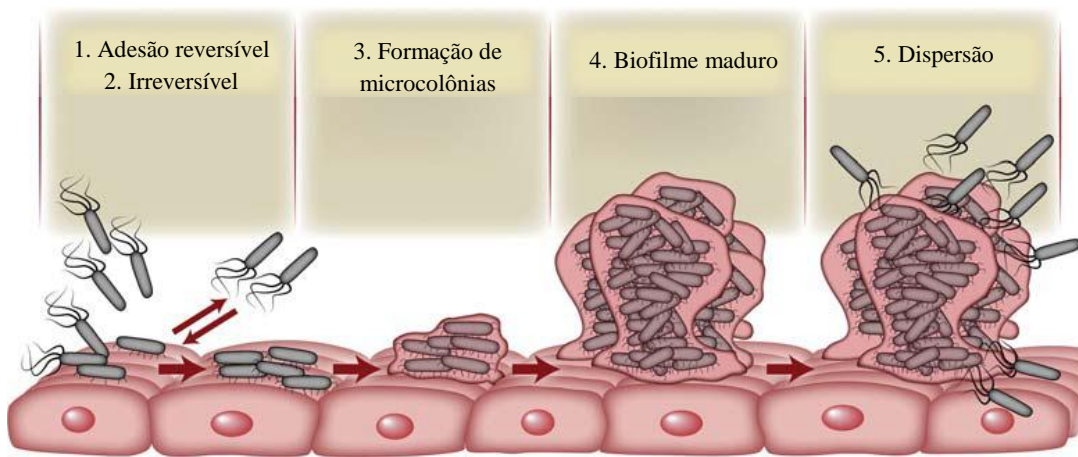


Figura 2. Etapas da formação de biofilme. Adaptado de KOSTAKIOTI *et al.* (2013).

A estrutura tridimensional formada pelo biofilme maduro é um processo dinâmico e envolve uma série de eventos moleculares coordenados que incluem mecanismos de adesão, agregação e expansão da comunidade (O'TOOLE *et al.*, 2000).

Na formação do biofilme, a adesão inicial é reversível permitindo que a bactéria abandone a superfície e retorne ao estado planctônico se necessário. Já a adesão irreversível é caracterizada pela transição das bactérias fracamente aderidas à superfície para a ligação permanente, este processo é mediado pela síntese de substâncias extracelulares poliméricas que compõem a matriz exopolissacarídica (EPS) (STOODLEY *et al.*, 2002). Outro fator importante no processo de adesão bacteriana é a expressão de adesinas, fatores de virulência responsáveis pelo reconhecimento e ligação a diversas moléculas das superfícies alvos que podem ser tecidos ou células ou materiais abióticos como vidros e plásticos (KLEMM e SCHEMBRI, 2000).

A ligação da bactéria na superfície resulta na formação de microcolônias mais complexas. Este processo ocorre por meio de uma série de fatores que, provavelmente, diferem entre as espécies bacterianas. Em bacilos Gram negativos, fatores de auto-agregação como curli e fímbrias auxiliam na formação e expansão destas microcolônias bacterianas aderidas à superfície (SCHEMBRI *et al.*, 2003).

Mecanismos de sinalização celular denominados de quórum sensing (QS) são responsáveis pela comunicação dentro do biofilme por meio da qual as bactérias regulam a expressão de genes especializados em resposta à densidade populacional. O QS depende da síntese de pequenas moléculas denominadas de autoindutoras, cuja produção aumenta de acordo com o aumento população bacteriana. O QS regula diversos processos fisiológicos incluindo *swarming*, biossíntese de antibióticos, transferência de plasmídeos conjugais e produção de fatores de virulência (HARDMAN *et al.*, 1998; WILLIAMS *et al.*, 2007).

A EPS na qual os micro-organismos vivem embebidos no biofilme é produzida pelas próprias bactérias e é composta, principalmente, por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Na maioria dos biofilmes, os micro-organismos representam menos de 10% da massa seca enquanto a matriz pode chegar a mais de 90% (FLEMMING e WINGENDER, 2010). A EPS possui diversas funções como auxiliar na formação da arquitetura tridimensional, na adesão a superfícies e na coesão do biofilme; permitir a comunicação entre as células; formar uma barreira de proteção, aumentando assim, a resistência do biofilme a antibacterianos e ao sistema imune do hospedeiro; manter o biofilme hidratado pela formação de canais de água em seu interior; fornecer nutrientes; facilitar a transferência horizontal de genes entre as células, entre outras. Apesar do conhecimento das funções da matriz, as interações moleculares entre seus componentes e a contribuição de cada um deles na integridade do biofilme ainda são pouco compreendidas (FLEMMING e WINGENDER, 2010).

Dentro do biofilme maduro há uma comunidade ativa que troca e compartilha produtos que desempenham uma função essencial na manutenção da arquitetura do biofilme e proporcionam um ambiente favorável para as bactérias que habitam o local. Nesta etapa do biofilme, ocorre a dispersão de bactérias. Apesar da dispersão passiva provocada pelas forças de cisalhamento, as bactérias também desenvolveram uma forma de perceber as mudanças no ambiente e avaliar se é mais benéfico ficar no biofilme ou retornar à forma planctônica. A dispersão do biofilme pode resultar de alterações na disponibilidade de nutrientes, aumento de produtos tóxicos, oscilações de oxigênio ou

outras condições de estresse (KARATAN e WATNICK, 2009). Em cepas de *E. coli* uropatogênicas (UPEC), por exemplo, o aumento extracelular de ferro induz a dispersão do biofilme (ROWE *et al.*, 2010).

A expressão gênica das células do biofilme bacteriano é diferente daquela observada em células planctônicas (STEWART e COSTERTON, 2001). A mudança da forma livre para a sésil envolve uma série de alterações na célula bacteriana para que esta inicie a produção de adesinas e de componentes da matriz extracelular. As bactérias que se fixam na superfície e adotam a forma de crescimento de biofilme possuem fenótipos muito diferentes da forma planctônica. Essa habilidade em “sentir” e responder a diversos sinais ambientais ocorre pelo controle da expressão gênica das bactérias (SCHEMBRI *et al.*, 2002).

A população bacteriana do biofilme é composta por uma subpopulação heterogênea de células em diferentes estágios de crescimento. Além das diferenças na fase de crescimento, as células do biofilme também são heterogêneas em relação à disponibilidade de oxigênio e nutrientes; sendo assim, a maioria das células se concentra próxima aos nutrientes e ao oxigênio enquanto que a minoria se encontra no interior do biofilme (SCHEMBRI *et al.*, 2003; SERRA *et al.*, 2013; SERRA e HENGGE, 2014).

Esta vida em comunidade pode gerar estresse para a bactéria. Devido ao grande número de células no biofilme, as bactérias têm que lidar com a competição pelos nutrientes, escassez de oxigênio e acúmulo de produtos tóxicos originados do metabolismo celular. No biofilme, a maioria das células apresenta crescimento lento ou até ausência de crescimento, esta situação é desencadeada por fatores liberados em resposta ao estresse, como por exemplo, o fator sigma σ^S (Rpos). O σ^S , o principal regulador da fase estacionária e da resposta ao estresse, controla mais de 500 genes em uma cadeia de regulação complexa (SCHEMBRI *et al.*, 2003; HENGGE, 2011). Consequentemente, células com alta atividade do σ^S apresentam um estado fisiológico diferente das células em crescimento, caracterizado pela alta resistência ao estresse, por células bacterianas pequenas e ovoides e pelo metabolismo energético alterado. Além disso, a expressão de curli, cuja função será discutida mais adiante, também é controlada

pelo σ^S por meio da regulação do CsgD, ativador transcricional do operon *csgBAC* de curli (HENGGE, 2011).

O σ^S controla a morfologia das células bacterianas e a expressão de CsgD por meio do segundo mensageiro intracelular monofosfato de guanosina dimérico cíclico (c-di-GMP). C-di-GMP promove a formação de biofilme em muitos gêneros bacterianos, pois estimula a biossíntese de adesinas e componentes da matriz, como curli e celulose, e inibe a motilidade pela repressão da expressão ou da atividade do flagelo. Sendo assim, c-di-GMP é o responsável pela mudança do estado planctônico móvel para o estado sésil do biofilme (HENGGE, 2009).

II - 3.1.1 A problemática das infecções associadas a biofilme

Nos últimos anos, o número de publicações envolvendo biofilmes aumentou drasticamente (BJARNSHOLT, 2013). Este interesse pode ser explicado pelo grande impacto que as infecções associadas a biofilme (IABs) têm na saúde pública. Segundo *National Institute of Health* (NIH) estas infecções representam mais de 80% das infecções bacterianas. Para agravar esta situação, muitas vezes a terapia utilizada é incapaz de erradicar o biofilme resultando em uma infecção crônica ou na necessidade de remoção cirúrgica do dispositivo ou prótese médica (DAVIES, 2003). De acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), somente nos Estados Unidos, o número anual de infecções hospitalares relacionadas a biofilme é estimado em 1,7 milhões (ROMLING *et al.*, 2014), acredita-se que estas infecções gerem um custo de cerca de 94 bilhões de dólares e causem mais de 500 mil mortes por ano (WOLCOTT *et al.*, 2010).

O espectro das IABs é amplo, incluindo infecções do trato urinário e de corrente sanguínea associadas a cateter, infecções associadas a próteses e válvulas e pneumonia associada à ventilação mecânica. Além dessas infecções relacionadas a dispositivos médicos, infecções em pacientes fibrocísticos, feridas crônicas e infecções urinárias também estão entre as principais IABs (ROMLING *et al.*, 2014).

O diagnóstico e o tratamento das IABs são difíceis, principalmente, pela falta de critérios relacionados a estas infecções. Os métodos de cultura bacteriana e de avaliação de suscetibilidade utilizados nos laboratórios de microbiologia clínica avaliam células planctônicas, conseqüentemente, uma terapia antibacteriana baseada nestes métodos pode levar à falha terapêutica ou a infecções recorrentes. Recentemente, o *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases* publicou um guideline direcionado a microbiologistas e infectologistas para auxiliar no diagnóstico e tratamento das principais IABs (HOIBY *et al.*, 2015).

Os biofilmes são recalcitrantes ao tratamento com antibacterianos devido a diferentes causas como a facilidade de transmissão de genes de resistência dentro desta comunidade, dificuldade de penetração dos antibacterianos na EPS, inativação do fármaco pelas altas concentrações de íons de metal e baixo pH e presença de células metabolicamente inativas que sobrevivem ao tratamento (LEWIS, 2008). A combinação destes fatores torna o biofilme até 1000 vezes mais tolerante e/ou resistente aos antibacterianos do que células planctônicas (DONLAN e COSTERTON, 2002). A necessidade de tratamentos mais eficientes e alternativos para IABs é evidente. Visando solucionar esta problemática, algumas estratégias vêm sendo propostas como: terapias com fagos, dispositivos médicos impregnados com antibacterianos, peptídeos antimicrobianos, agentes quelantes, agentes antivirulência entre outros (KOSTAKIOTI *et al.*, 2013).

II - 3.1.2. Modelos de biofilme - macrocolônias

In vitro, diferentes modelos podem ser utilizados para avaliação de biofilmes bacterianos (figura 3). O modelo mais utilizado consiste no crescimento do biofilme submerso que pode ser avaliado em sistema de fluxo ou em placa de 96 poços. O biofilme submerso cresce em uma superfície sólida inerte, circundado por meio de cultura contendo nutrientes; este sistema mimetiza dispositivos médicos como cateteres (STEWART e FRANKLIN, 2008). No biofilme em película, o crescimento bacteriano ocorre na interface do líquido que fornece os nutrientes com o ar como ocorre nos

ecossistemas aquáticos (VLAMAKIS *et al.*, 2013). Por fim, no modelo de macrocolônias, o biofilme cresce em placas de ágar nutriente inoculadas com suspensão bacteriana e incubadas por alguns dias (AGUILAR *et al.*, 2007; SERRA e HENGGE, 2014). Situação semelhante ocorre em infecções de tecidos moles e infecções associadas à fibrose cística (MCBAIN, 2009).

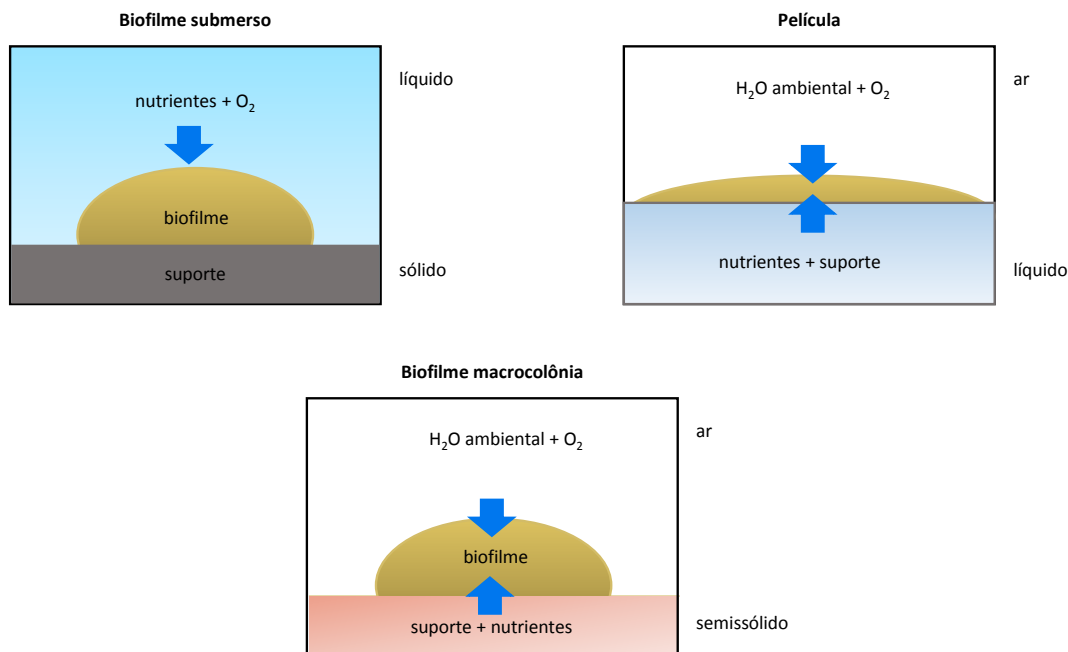


Figura 3. Modelos de biofilme. Representação esquemática de três tipos de biofilme encontrados na natureza, na indústria e na área médica. Adaptado de SERRA e HENGGE (2014).

A morfologia da macrocolônia resulta da produção de diferentes componentes da matriz extracelular do biofilme como curli, celulose, ácidos nucleicos e proteínas (HAUSSLER e FUQUA, 2013). Estudos prévios mostram que curli e celulose, principais componentes da matriz de *Salmonella typhimurium* e *E. coli*, influenciam na morfologia das macrocolônias. Os diferentes morfotipos apresentados por estas espécies podem ser visualizados em ágar contendo o corante Congo Red capaz de corar curli (ZOGAJ *et al.*, 2003; BOKRANZ *et al.*, 2005; BARNHART e CHAPMAN, 2006). A figura 4 mostra os diferentes morfotipos correspondentes às diferenças na produção dos componentes da matriz extracelular.



Figura 4. Morfotipos de colônias de *Salmonella typhimurium* crescidas em ágar contendo Congo Red após 48 h a 26 °C. Adaptado de BARNHART e CHAPMAN (2006).

Em 1987, Shapiro observou que após um período prolongado de incubação as colônias de *E. coli* apresentavam subpopulações com diferentes morfologias, tamanhos e aspectos (SHAPIRO, 1987). Essas distintas subpopulações resultam das diferenças fisiológicas encontradas dentro do biofilme bacteriano. Serra et al. realizaram um estudo detalhado sobre a estrutura e a fisiologia das macrocolônias de *E. coli* K12. A morfologia das células bacterianas na macrocolônia variava dependendo da distância do ágar, fonte de nutrientes. Nas camadas inferiores e nas bordas da macrocolônia, zonas próximas ao ágar, a morfologia das células indicou fisiologia de crescimento pós-exponencial (células alongadas com flagelos). Na parte mais interna e nas camadas superiores da macrocolônia onde há limitação de nutrientes, as células bacterianas exibiram características morfológicas da fase estacionária (células ovoides produzindo curli). Por fim, a camada intermediária da macrocolônia apresentou heterogeneidade fisiológica, caracterizando uma zona de transição na qual foram encontradas células ovoides produzindo curli e células sem flagelos e nem curli, estas células, provavelmente, estavam na fase de transição entre a perda do flagelo e o início da produção de curli. Estas alterações morfológicas junto com as alterações globais na expressão gênica e na fisiologia celular dependem da indução da subunidade sigma da RNA polimerase (σ^S) e do segundo mensageiro c-di-GMP (SERRA *et al.*, 2013).

Este estudo descreve bem as diferenças morfológicas e fisiológicas encontradas nos biofilmes e destaca o modelo de macrocolônia como uma potencial ferramenta para o melhor entendimento destas comunidades bacterianas.

II - 3. 2 Adesinas fimbriais

Como dito anteriormente, a adesão é uma etapa fundamental na patogênese bacteriana. Após a adesão bacteriana pode ocorrer a invasão celular, caso a bactéria esteja aderida a uma célula eucariótica, ou então, a formação do biofilme (KLEMM e SCHEMBRI, 2004). As adesinas fimbriais (fímbrias ou pili) são apêndices proteicos encontrados na superfície externa de muitas bactérias, essenciais para o processo de adesão entre bactérias e superfícies bióticas ou abióticas. Estas estruturas também auxiliam na invasão celular, na formação de biofilme, na motilidade e no transporte de proteínas e DNA através da membrana. Em Enterobacteriaceae as principais fímbrias pertencem ao grupo conhecido como *chaperone-usher*, além da fímbria de curli já mencionada anteriormente (HOSPENTHAL *et al.*, 2017).

II - 3.2.1 Fímbrias do grupo *chaperone-usher*

As principais representantes do grupo *chaperone-usher* são fímbria tipo 1, fímbria tipo 3 e pili tipo P (*pyelonephritis-associated* (P) pilus) (BUSCH *et al.*, 2015). Estas fímbrias são encontradas na maioria das espécies da família Enterobacteriaceae como *E. coli*, *Salmonella* spp, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Enterobacter* spp, *Serratia* spp., *Citrobacter* spp (SAUER *et al.*, 2004; STAHLHUT *et al.*, 2013).

Os genes que codificam as fímbrias do grupo *chaperone-usher* estão localizados em operons e, geralmente, são encontrados no cromossomo. Estes genes estão organizados de forma semelhante em diferentes bactérias: a região 5' contém genes reguladores e promotores e na região *downstream* está o operon que contém componentes estruturais e de montagem (FELEK *et al.*, 2011). Estas fímbrias possuem componentes básicos como proteínas acessórias *chaperone* (proteína periplasmática) e *usher* (proteína de membrana externa) necessárias para a montagem da fímbria, várias subunidades diferentes e uma adesina (FRONZES *et al.*, 2008; BUSCH *et al.*, 2015).

A extremidade da fímbria tipo 1 é composta por três cópias únicas das subunidades FimH (adesina), FimG e FimF. A subunidade FimA é mais abundante e se encontra logo após a FimF. Na fímbria tipo 1, *chaperone* é codificada pelo gene *fimC*

enquanto que a proteína *usher* é codificada pelo gene *fimD* (figura 5 e 6) (REMAUT *et al.*, 2008; BUSCH *et al.*, 2015).

O pili tipo P é formado por seis subunidades diferentes: na extremidade distal há uma cópia da PapG (adesina) seguida por uma subunidade PapF, 5-10 cópias da subunidade PapE e uma subunidade PapK. A PapA é a subunidade mais abundante com mais de 1000 cópias e esta ligada à PapK; por último, uma cópia da subunidade PapH está ligada na membrana externa da bactéria. As proteínas *chaperone* e *usher* são codificadas pelos genes *papD* e *papC*, respectivamente (figura 5) (BUSCH *et al.*, 2015).

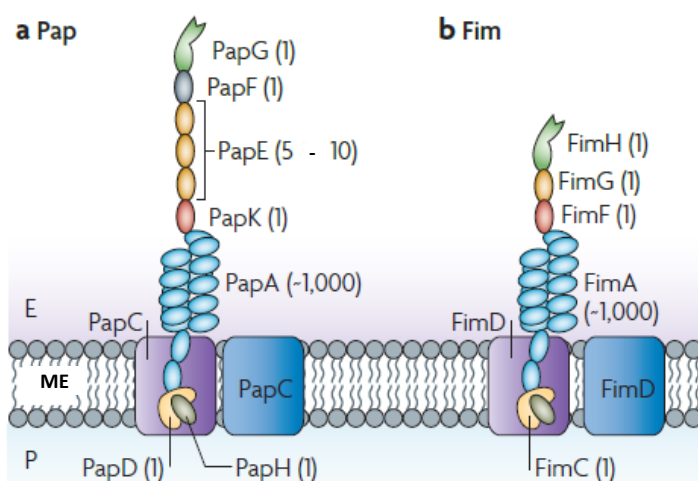


Figura 5. A) Estrutura de pili tipo P (*pap*) e B) fímbria tipo 1 (*fim*). As subunidades estão representadas por diferentes cores. Os números indicam o número de cópias de cada subunidade. As adesinas (verde) são responsáveis pela adesão às células do hospedeiro; proteínas *chaperones* (amarelo) estão ligadas a última subunidade de cada fímbria; as proteínas *usher* (roxo e azul) formam um poro na membrana externa (ME). A subunidade terminal no pili tipo P na ME é PapH (cinza), esta subunidade não é conhecida no sistema Fim. Fonte: BUSCH e WAKSMAN (2012).

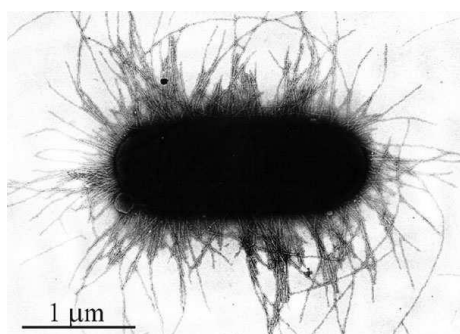


Figura 6. Micrografia eletrônica da fímbria tipo 1. A célula bacteriana possui de 100 a 500 fímbrias distribuídas na sua superfície, cada uma com 7 nm de largura e 0,2 a 2 µm de comprimento. Fonte: KLEMM e SCHEMBRI (2004).

A fímbria tipo 3 foi descrita em *Klebsiella* spp e, praticamente todas as cepas *K. pneumoniae* são capazes de expressá-la. Esta fímbria é codificada pelo operon *mrkABCDF* no qual MrkB e MrkC correspondem às proteínas *chaperone* e *usher*, respectivamente. MrkA é a subunidade mais abundante, MrkD é a adesina e MrkF está envolvida na montagem e estabilidade da fímbria (ALLEN *et al.*, 1991; HUANG *et al.*, 2006; MADSEN *et al.*, 2016).

A adesão às células do hospedeiro é mediada pelas adesinas, subunidades localizadas nas extremidades das fímbrias, as quais conferem o tropismo de cada bactéria uma vez que são elas que reconhecem os carboidratos específicos do epitélio do hospedeiro. PapG reconhece glicolipídeos Gal α 1-4Gal do rim por isso está associada à pielonefrite enquanto FimH liga-se a proteínas manosiladas na superfície do epitélio da bexiga e, por isso, está associada a cistite (THANASSI *et al.*, 2012; BUSCH *et al.*, 2015). O receptor da adesina da fímbria tipo 3 (MrkA) ainda não foi identificado (STAHLHUT *et al.*, 2013).

A expressão das fímbrias tipo 1 e tipo 3 pode ser determinada pela aglutinação a eritrócitos de diferentes animais na presença de manose. As bactérias que expressam fímbrias do tipo 1 aglutinam com eritrócitos de porquinho da índia assim como com leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) na ausência de manose (KROGFELT *et al.*, 1990). Enquanto a fímbria tipo 3 é caracterizada pela aglutinação a eritrócitos bovinos tratados com ácido tânico (ALLEN *et al.*, 1991), eritrócitos de ovelha comercialmente disponíveis e leveduras tanto na presença quanto ausência de manose (STAHLHUT *et al.*, 2012). Devido à influência da manose na aglutinação, as fímbrias do tipo 1 e do tipo

3 são denominadas manose sensível e manose resistente, respectivamente (KROGFELT *et al.*, 1990; SEBGHATI *et al.*, 1998).

II - 3.2.2 Curli

A importância de curli na formação do biofilme já foi descrita acima. O papel desempenhado por curli na patogênese ainda não foi bem elucidado. Esta organela parece desempenhar um papel importante durante a adesão e invasão das células, a interação com proteínas do hospedeiro e a ativação do sistema imune do hospedeiro. Curli é capaz de ligar-se a proteínas da matriz extracelular como fibronectina e laminina, a proteínas envolvidas na coagulação como plasminogênio e fibrinogênio e a moléculas do sistema imune, ativando assim, o sistema imune inato (BARNHART e CHAPMAN, 2006).

Os genes responsáveis pela codificação de curli estão organizados em dois operons *csgBAC* e *csgDEFG*. CsgA é secretada através da membrana externa como um peptídeo solúvel e é transformada em fibra amiloide na superfície da célula pela subunidade CsgB (BARNHART e CHAPMAN, 2006; EVANS e CHAPMAN, 2014). A subunidade CsgC, uma pequena proteína periplasmática, é um potente inibidor da formação de CsgA amiloide; na sua ausência CsgA forma agregados intracelulares tóxicos (EVANS *et al.*, 2015). CsgE e CsgF são proteínas periplasmáticas ligadas a CsgG que é uma proteína de membrana externa necessária para a estabilidade e secreção de CsgA e CsgB (figura 7). CsgD é o fator de transcrição que regula de forma positiva o operon *csgBAC* (BARNHART e CHAPMAN, 2006; EVANS e CHAPMAN, 2014).

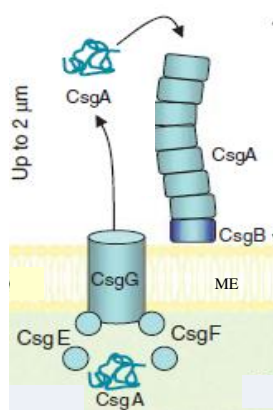


Figura 7. Estrutura da fímbria de curli. ME: membrana externa. Fonte: FRONZES *et al.* (2008).

II - 4. Resistência bacteriana

A descoberta de agentes antibacterianos representa, indiscutivelmente, um grande avanço em relação aos cuidados relacionados à saúde e, atualmente, eles são indispensáveis para o sistema de saúde. Avanços da medicina, como cirurgias de grande porte, transplantes de órgãos, tratamentos de bebês prematuros e quimioterapias não seriam possíveis se não houvesse tratamentos eficazes contra patógenos bacterianos (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013). Entretanto, o uso de antibacterianos causa danos extensivos à microbiota do hospedeiro criando um ambiente propício para o desenvolvimento de patógenos oportunistas e aumentando a pressão seletiva, favorecendo assim, o surgimento de resistência bacteriana (DETHLEFSEN *et al.*, 2008).

Desde a descoberta da penicilina, todo novo antibacteriano desenvolvido é seguido pelo surgimento de resistência bacteriana (CLATWORTHY *et al.*, 2007). Atualmente, a resistência representa um grande problema para a saúde pública mundial. Para agravar esta situação, as pesquisas envolvendo novos fármacos estão estagnadas e, conseqüentemente, não há perspectivas de um novo agente antibacteriano ativo contra bactérias multirresistentes num futuro próximo. O século 20, “o século dos antibióticos”, foi marcado pela descoberta e desenvolvimento de novos e mais ativos agentes antibacterianos, entretanto, nenhuma nova classe foi disponibilizada desde 1987 (NORDMANN, 2014).

Estima-se que na Europa 25000 pessoas morram por ano e nos Estados Unidos (EUA) 23000 em decorrência de infecções causadas por bactérias resistentes aos antibacterianos (CDC, 2013). Estes números não são precisos, pois estas infecções são mais comuns em indivíduos em uso prolongado de antibacterianos; sendo assim, é difícil determinar se a resistência é a causa da morte ou a correlação da longa terapia, da hospitalização e da doença de base (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013).

Diante da problemática envolvendo a questão da resistência bacteriana, a Organização Mundial de Saúde publicou, recentemente, um documento intitulado “*Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics*” incentivando os pesquisadores a buscar novos agentes antibacterianos para o combate de bactérias multirresistentes. Este documento também classifica enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos como prioridade máxima para a pesquisa de novos compostos antibacterianos (**Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics** 2017).

II - 4.1 NDM (New Delhi metalo- β -lactamases)

O gênero *Enterobacter* é intrinsecamente resistente a maioria das penicilinas, cefalosporinas de primeira geração e cefoxitina devido à produção de uma β -lactamase constitutiva denominada AmpC. A resistência às cefalosporinas de terceira geração geralmente é causada pela superprodução desta enzima que ocorre devido à desrepressão cromossomal do gene ou pela aquisição do gene *ampC* plasmidial (DAVIN-REGLI e PAGES, 2015).

Além da resistência intrínseca, este gênero possui uma alta capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência, como por exemplo, a aquisição de carbapenemases (SANDERS e SANDERS, 1997; CHAVDA *et al.*, 2016). A emergência de cepas produtoras destas enzimas capazes de hidrolisar os carbapenêmicos representa um grande desafio terapêutico. Atualmente, o gênero *Enterobacter* representa o terceiro

maior produtor de carbapenemases da família Enterobacteriaceae (CHAVDA *et al.*, 2016; KARLOWSKY *et al.*, 2017).

Os carbapenêmicos são antibacterianos utilizados no tratamento de infecções bacterianas graves causadas por enterobactérias multirresistentes. Por isso a importância destes agentes (doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem) que representam antibacterianos de última escolha (NORDMANN *et al.*, 2011a). A resistência a esta classe de antibacterianos pode envolver a combinação de alguns mecanismos como: diminuição da permeabilidade da membrana externa e superexpressão de bombas de efluxo associadas com a superprodução de enzimas β -lactamases, ou então, a produção de carbapenemases (NORDMANN *et al.*, 2009). A disseminação dessas carbapenemases móveis (codificadas por plasmídeos) em enterobactérias limita muito as opções de tratamento, pois além destas enzimas conferirem resistência aos carbapenêmicos e a outros β -lactâmicos, estes patógenos também são resistentes a outras classes de antibacterianos (WALSH, 2010).

De acordo com a classificação das β -lactamases proposta por Ambler que se baseia na analogia da sequência dos peptídeos, NDM-1 pertence ao grupo B composto pelas metalo enzimas (AMBLER, 1980). Esta carbapenemase possui íons de zinco em seu sítio ativo e, é capaz de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, mas não é capaz de hidrolisar o aztreonam (NORDMANN, 2014).

A NDM-1 foi identificada pela primeira vez na Suécia, em 2008, em uma cepa de *K. pneumoniae* isolada da urina de um paciente com história de internação prévia em um hospital de Nova Déli, na Índia. Neste paciente também foi isolada uma cepa de *E. coli* produtora de NDM-1 da microbiota intestinal (YONG *et al.*, 2009). A origem do gene *bla*_{NDM-1} é desconhecida, mas acredita-se que este gene tenha sido capturado do cromossomo de algum organismo ambiental (NORDMANN *et al.*, 2011c).

Até o momento, já foram descritas 16 variantes da enzima NDM (<http://www.lahey.org/studies/other.asp>). O gene *bla*_{NDM-1} pode ser carregado por vários plasmídeos e, raramente, é integrado ao cromossomo (NORDMANN *et al.*, 2011c). Estes plasmídeos também podem conter vários outros genes de resistência como

cefalosporinases, β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e genes de resistência a outras classes de antibacterianos como aminoglicosídeos, macrolídeos e sulfametoxazol. A associação de tantos genes de resistência em um único isolado é muito rara, até mesmo entre bactérias produtoras de carbapenemases. Alguns destes isolados são suscetíveis somente à tigeciclina e polimixina (NORDMANN, 2014).

Os isolados de enterobactérias produtores de NDM-1 podem causar uma variedade de infecções como infecções do trato urinário e pulmonares, bacteremia, diarreia, peritonite, infecções de tecidos moles e infecções associadas a dispositivos médicos (NORDMANN *et al.*, 2011b).

No Brasil, o primeiro relato de NDM-1 foi descrito em 2013. Esta enzima foi identificada em *Providencia rettgeri* isolada no Rio Grande do Sul (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013). Após este relato, um estudo retrospectivo avaliou cepas isoladas em 2012 no mesmo hospital em que a *P. rettgeri* foi isolada. Seis cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae* produtoras de NDM-1 foram identificadas, todas apresentavam o mesmo perfil clonal e eram suscetíveis somente à amicacina e à polimixina. Além do gene *bla*_{NDM-1}, as cepas carregavam os genes *bla*_{CTX-M-15} (codifica uma ESBL), *qnrB4* (confere resistência às quinolonas), *aac(6)-Ib* (confere resistência aos aminoglicosídeos) (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2014).

Um estudo publicado por Rozales *et al.* investigou a presença de seis carbapenemases, incluindo NDM-1, em enterobactérias com suscetibilidade reduzida aos carbapenêmicos obtidas de 17 hospitais do Rio Grande do Sul. Dos 1134 isolados analisados, 11 (0,97%) apresentaram o gene *bla*_{NDM-1}; este gene foi detectado em duas cepas de *Morganella morganii* e em nove cepas do CEC. Oito cepas do CEC, provenientes de dois hospitais, apresentaram o mesmo perfil clonal mostrando uma possível disseminação horizontal entre estes hospitais; somente uma cepa apresentou um perfil clonal distinto a qual foi isolada de um terceiro hospital (ROZALES *et al.*, 2014).

A prevalência de cepas de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC) aumentou muito na última década (LEE e DOI, 2014; MORRILL *et al.*, 2015). As

infecções causadas por estas cepas estão associadas a uma alta mortalidade e os custos envolvidos são extremamente elevados (BARTSCH *et al.*, 2017). As opções terapêuticas para o tratamento de ERC são muito limitadas e o melhor tratamento para estas infecções ainda é desconhecido. Estudos indicam que a terapia combinada com dois ou mais antibacterianos está associada a um melhor desfecho do que a monoterapia (FALAGAS *et al.*, 2014; TANGDEN *et al.*, 2014; YAMAMOTO e POP-VICAS, 2014; MORRILL *et al.*, 2015).

II- 5. *Galleria mellonella* - modelo *in vivo*

O estudo de doenças infecciosas requer modelos animais como hospedeiros. Por razões éticas óbvias é impossível conduzir em humanos testes experimentais primários como identificação da virulência dos patógenos, avaliação da resposta imune à infecção ou avaliação da toxicidade e da efetividade de compostos antimicrobianos. O modelo murino *Mus musculus* tem sido o modelo de hospedeiro preferido para experimentos *in vivo*, pois possui características anatômicas, imunológicas e de suscetibilidade a patógenos semelhantes aos humanos e ratos. Por outro lado, existem muitas desvantagens relacionadas a este modelo animal como problemas éticos; obstáculos de logística incluindo o longo período de reprodução, a dificuldade e os altos custos para obtenção e manutenção do número de ratos necessário para a realização de experimentos (DESBOIS e COOTE, 2012; GLAVIS-BLOOM *et al.*, 2012).

Humanos e invertebrados possuem características evolutivas semelhantes o que possibilita o uso de invertebrados como modelo de hospedeiro para estudos *in vivo*. O emprego de *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella* confere diversas vantagens em relação aos modelos de mamíferos, razão pela qual seu uso vem aumentando. Dentre as vantagens podemos citar o baixo custo destes invertebrados, a fácil manutenção, o tamanho reduzido e o curto ciclo de vida que facilitam a utilização deles em experimentos laboratoriais (GLAVIS-BLOOM *et al.*, 2012).

Galleria mellonella é um inseto da ordem *Lepidoptera* e família *Pyralidae* que vive geralmente em colmeias e ninhos de abelhas e alimenta-se de pólen e cera, portanto, pode ser considerada uma peste que acomete as abelhas. O ciclo de vida deste inseto é de aproximadamente 7 a 8 semanas: após sair do ovo, a larva passa por seis estágios, processo que leva em torno de 5 a 6 semanas a 25 – 28 °C. Em seguida, a pré-pupa e a pupa são formadas e, após duas semanas, surge a mariposa adulta (figura 8) (WOJDA, 2016).



Figura 8. Estágios do inseto *Galleria mellonella*. Fonte: RAMARAO *et al.* (2012).

Comparado com outros modelos de invertebrados como os nematódeos, os insetos possuem um sistema imunológico mais complexo. A resposta imune inata dos insetos consiste em resposta celular e humoral e, apresenta um alto grau de homologia funcional e estrutural ao sistema imune de mamíferos. A resposta celular é mediada por células fagocíticas, denominadas hemócitos, encontradas na hemolinfa (fluido com funções análogas ao sangue em mamíferos). Os hemócitos também estão envolvidos no encapsulamento dos micro-organismos e na coagulação. A resposta imune humoral é composta por moléculas que imobilizam ou matam os patógenos as quais incluem proteínas do sistema complemento *like*, melanina e peptídeos antimicrobianos (TSAI *et al.*, 2016). Vale ressaltar que a resposta imune inata é a principal defesa contra patógenos em mamíferos (KAVANAGH e REEVES, 2004; RAMARAO *et al.*, 2012). Além do sistema imune, semelhanças entre células epiteliais do intestino médio de larvas de insetos e células intestinais dos mamíferos foram descritas. Por fim, alguns componentes essenciais para o processo de infecção bacteriana como adesão celular, resistência a peptídeos antimicrobianos, degradação do tecido e adaptação ao estresse oxidativo

parecem ser importantes tanto em insetos quanto em humanos (RAMARAO *et al.*, 2012).

Uma das principais vantagens do emprego de *G. mellonella* como modelo animal é a capacidade de sobreviver a 37 °C, possibilitando a avaliação de patógenos, fatores de virulência e compostos na mesma temperatura do corpo humano. A infecção deste invertebrado ocorre no último estágio larval quando as larvas atingem, aproximadamente, 2 cm e 250 mg. O composto ou patógeno é inoculado diretamente na hemocele através da *proleg* da larva o que possibilita a inoculação de uma quantidade precisa (GLAVIS-BLOOM *et al.*, 2012; TSAI *et al.*, 2016).

Este modelo animal é suscetível a numerosos patógenos o que o torna um modelo de hospedeiro ideal para a avaliação de mecanismos de virulência e a eficácia de potenciais compostos antimicrobianos (GLAVIS-BLOOM *et al.*, 2012). O uso de um inóculo bacteriano apropriado é crucial para avaliação da eficácia de antibacterianos em *G. mellonella*. O inóculo utilizado não deve matar as larvas rapidamente, mas sim matar uma proporção suficiente durante o período de incubação que permita avaliar as variações na sobrevivência das larvas em diferentes grupos de tratamento (DESBOIS e COOTE, 2012).

No entanto, este modelo possui algumas limitações. O genoma da *G. mellonella* ainda não foi totalmente sequenciado, faltam centros especializados que forneçam cepas de referência para serem utilizadas pelos pesquisadores e não existem métodos estabelecidos para a construção de cepas mutantes (TSAI *et al.*, 2016; WOJDA, 2016). Com o crescente uso da *G. mellonella* em pesquisas é possível que estas questões sejam solucionadas em um futuro próximo tornando este modelo ainda mais atrativo para experimentos *in vivo*.

III - OBJETIVOS

III - 1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como principal objetivo avaliar os mecanismos de adesão de cepas de *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* produtoras de NDM-1, bem como, a relação destes mecanismos com a formação de biofilme.

III - 2. Objetivos específicos

Todos objetivos abaixo são referentes às cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae* produtoras de NDM-1:

- Determinar a formação de biofilme;
- Investigar a presença de genes codificadores de adesinas fimbrias em diferentes regiões morfológicas geradas pelas macrocolônias;
- Determinar a virulência em modelo *in vivo* de *G. mellonella*;
- Testar a eficácia da ação de antibacterianos sozinhos e combinados *in vitro* e em modelo de *G. mellonella*.
- Avaliar o papel da fimbria tipo 1 e da fimbria tipo 3 na formação de biofilme e na adesão às células eucarióticas.

IV - CAPÍTULO

IV – O CAPÍTULO 1 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 59 – 76.

Brust FR, Boff L, da Silva Trentin D, Pedrotti Rozales F, Barth AL, Macedo AJ. Macrocolony of NDM-1 Producing *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* Generates Subpopulations with Different Features Regarding the Response of Antimicrobial Agents and Biofilm Formation. **Pathogens**. 2019 Apr 14;8(2). pii: E49. doi:10.3390/pathogens8020049.

IV - CAPÍTULO 2 - O texto completo do capítulo 2, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 79 – 93, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Neste trabalho foi realizado o sequenciamento genômico completo de três isolados clínicos de *Enterobacter hormaechei*. A análise dos genomas permitiu conhecer a estrutura dos operons que codificam a fímbria tipo 1 (*fim*) e, a fímbria tipo 3 (*mrk*). Por fim, a capacidade de adesão, em superfícies abióticas e bióticas, foi avaliada em cepas selvagens e em cepas mutantes para estas fímbrias.

V- DISCUSSÃO GERAL

Diante da importância do gênero *Enterobacter* como patógeno nosocomial e do escasso conhecimento em relação aos mecanismos de virulência deste patógeno a proposta deste trabalho foi entender melhor o processo de adesão bacteriana e a formação de biofilme de isolados de *E. hormaechei* subsp. *oharae* produtores de NDM-1. Nove isolados clínicos foram avaliados neste estudo: seis de swab retal, um ambiental (pia), um de urina e um de líquido. Estes isolados foram obtidos de três hospitais da cidade de Porto Alegre (ROZALES *et al.*, 2014).

O crescimento de macrocolônias permite avaliar diferentes zonas morfológicas que resultam das diferenças fisiológicas encontradas no biofilme (SERRA e HENGGE, 2014). As macrocolônias de *E. hormaechei* subsp. *oharae* geraram subpopulações distintas que apresentaram diferenças relacionadas à formação de biofilme, à virulência em *G. mellonella* e à resposta ao tratamento com antibacterianos (meropenem, rifampicina e polimixina B sozinhos e combinados).

Algumas subpopulações da mesma macrocolônia também apresentaram diferentes perfis de suscetibilidade ao meropenem. O gene *bla*_{NDM-1}, localizado em um plasmídeo, não foi detectado nas subpopulações com MIC ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ comprovando que a perda deste gene é capaz de restaurar a suscetibilidade ao meropenem. Os plasmídeos carreadores de genes de resistência geralmente requerem um alto gasto energético da bactéria e, por isso, na ausência da pressão seletiva dos antibacterianos, as bactérias tendem a perder estes plasmídeos (ANDERSSON e HUGHES, 2011; GOTTIG *et al.*, 2016).

A virulência das quatro subpopulações originadas da macrocolônia primária 798F (isolado de urina) foi determinada *in vivo* em modelo de *G. mellonella*. A curva de sobrevivência das larvas foi avaliada após a inoculação de quatro doses bacterianas diferentes. O inóculo $1,0 \times 10^7$ CFU/larva foi escolhido para a avaliação da eficácia do tratamento com antibacterianos. As subpopulações identificadas como 798-1S e 798-4S apresentaram uma tendência a menor e a maior virulência, respectivamente, e por isso foram escolhidas para avaliação da eficácia da monoterapia com meropenem, rifampicina e polimixina B e da terapia combinada com estes antibacterianos. A

monoterapia com meropenem e a combinação tripla foram capazes de aumentar a sobrevivência das larvas infectadas com 798-4S, entretanto, nenhum dos tratamentos foi capaz de aumentar a sobrevivência das larvas infectadas com 798-1S. Os resultados obtidos *in vivo* mostraram algumas discrepâncias em relação aos resultados *in vitro*. A polimixina B não foi capaz de aumentar a sobrevivência das larvas apesar da suscetibilidade dessas subpopulações *in vitro*. Apesar de a combinação tripla apresentar efeito sinérgico contra as duas subpopulações testadas, *in vivo* observamos que ela só teve efeito contra 798-4S. Por outro lado, o tratamento com meropenem teve um efeito positivo nas larvas inoculadas com 798-4S apesar da resistência *in vitro*. Discrepâncias entre os resultados *in vitro* e *in vivo* já foram relatadas em outros estudos (BENTHALL *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2016). A escolha da terapia antibacteriana é baseada principalmente nos resultados obtidos *in vitro*. Entretanto, os dados acima sugerem que estes resultados podem não ser reprodutíveis *in vivo* podendo levar à falha terapêutica. Estudos correlacionando resultados *in vivo* e *in vitro* com o desfecho clínico dos pacientes são necessários para avaliar qual a melhor opção de tratamento para infecções causadas por estas bactérias multirresistentes. O fato de uma cepa de *E. hormaechei* subsp. *oharae* gerar subpopulações com diferenças relacionadas à virulência e à resposta ao tratamento representa um agravante em relação às infecções crônicas causadas por estas bactérias multirresistentes e torna o tratamento destas infecções um desafio ainda maior.

As subpopulações de cinco (67F, 798F, 821F, 977F e 1105F) das nove macrocolônias avaliadas apresentaram diferenças significativas em relação a formação de biofilme. É possível que isto ocorra devido a diferenças na expressão dos componentes do biofilme. Estudos prévios mostraram um aumento da produção de celulose e curli, componentes da matriz extracelular do biofilme, em regiões geradas pelas macrocolônias de *E. coli* (BOKRANZ *et al.*, 2005; RICHTER *et al.*, 2014; SCHAUFLER *et al.*, 2016). Richter *et al.* sugerem que as diferenças encontradas nas diferentes regiões da macrocolônia resultem de mutações espontâneas que ocorrem dentro do biofilme (RICHTER *et al.*, 2014).

Em bactérias patogênicas, as fímbrias são fatores de virulência cruciais envolvidas no processo de adesão e na formação de biofilme e, por isso, o entendimento do seu papel nas infecções bacterianas é de grande interesse (ALLEN *et al.*, 2012). A fimbria tipo 3 mostrou ter uma grande importância na formação de biofilme em cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae*. Apenas as subpopulações da macrocolônia 798 que continham o gene *mrkB* (798-1S e 798-2S) foram capazes de formar biofilme.

De acordo com os resultados de hemaglutinação, todas as cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae* expressam a fimbria tipo 1 enquanto somente as cepas 798F e 977F expressam a fimbria tipo 3. Estes resultados foram confirmados pelo sequenciamento completo do genoma das cepas 7F, 798F e 997F que mostrou que somente a cepa 798F possui o *cluster mrk* responsável por codificar fimbria tipo 3. As cepas 798F e 977F foram isoladas no mesmo hospital.

A estrutura do operon *fim* identificado em cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae* é semelhante a estrutura do operon de *Salmonella enterica* (KISIELA *et al.*, 2013). Paauw *et al.* identificaram em uma cepa de *E. hormaechei* isolada de um surto na Holanda a presença de quatro fragmentos de DNA que codificavam fímbrias putativas com maior homologia à fimbria tipo 1 produzida pela *S. enterica* (PAAUW *et al.*, 2009). A estrutura do operon *mrk* em cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae* é semelhante a encontrada em cepas de *K. pneumoniae*. A construção de cepas mutantes para fimbria tipo 1 (997F Δ *fim*) ou para fimbria tipo 3 (798F Δ *mrk*) mostrou que ambas desempenham um papel fundamental na formação do biofilme, uma vez que as cepas mutantes não foram capazes de formar biofilme. Curiosamente, 798F Δ *mrk* não foi capaz de formar biofilme mesmo expressando a fimbria tipo 1.

A fimbria tipo 3 é expressa por praticamente todas as cepas de *K. pneumoniae* e, o operon *mrkABCDF* geralmente está localizado no cromossomo. Entretanto, apenas 2% dos isolados de *E. coli* expressam esta fimbria (STAHLHUT *et al.*, 2013) e, neste gênero, ela é codificada por plasmídeos (BURMOLLE *et al.*, 2008; MADSEN *et al.*, 2016). Em *K. pneumoniae*, a fimbria tipo 3 é responsável pela adesão a superfícies bióticas e abióticas e formação de biofilme (DI MARTINO *et al.*, 2003; JAGNOW e

CLEGG, 2003). Esta fímbria parece ter a mesma função em outros membros da família Enterobacteriaceae, uma vez que a inserção do pOLA52 (plasmídeo que contém o operon *mrkABCDF*) aumentou significativamente a formação de biofilme em *S. Typhimurium*, *K. pneumoniae*, *Kluyvera* sp. e *Enterobacter aerogenes* (BURMOLLE *et al.*, 2008). Os resultados do presente estudo sugerem que o operon *mrkABCDF* esteja localizado em um plasmídeo nas cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae* avaliadas pois, como mostra o gel do perfil de plasmídeos, a cepa 798 apresenta um plasmídeo de ~130 kb não identificado nas outras cepas (7F e 997F).

A capacidade de adesão de *E. hormaechei* subsp. *oharae* a células epiteliais da bexiga foi semelhante a *E. coli* enteroagregativa 042, uma cepa usada como controle positivo para experimentos de adesão e formação de biofilme (CHAUDHURI *et al.*, 2010; BOLL *et al.*, 2013). Diferentemente dos resultados do biofilme, a adesão celular de cepas mutantes para a fímbria tipo 1 ou fímbria tipo 3 não apresentou diferenças quando comparada com as cepas selvagens. Provavelmente outras fímbrias estejam envolvidas na adesão às células eucarióticas, ou então, a presença de uma destas fímbrias já é suficiente para o processo de adesão.

Os meios de cultura suplementados com glicose estimularam a formação de biofilme nas cepas que possuíam a fímbria tipo 3 (798F e 977F). De acordo com um estudo realizado por Li e colaboradores meios de cultura ricos em glicose aumentam a concentração intracelular de c-di-GMP e a expressão de MrkH e MrkI resultando em um aumento da expressão da fímbria tipo 3 em *K. pneumoniae* (LIN *et al.*, 2016).

A aquisição de plasmídeos mostra a versatilidade do gênero *Enterobacter* em adquirir elementos genéticos móveis que conferem benefícios à bactéria, seja pela codificação de genes de virulência, como a fímbria tipo 3, ou de genes de resistência, como o gene *bla_{NDM-1}*. Mecanismos de virulência e de resistência bacteriana são importantes para o sucesso de uma infecção, pois auxiliam na evasão do sistema imune do hospedeiro e diminuem a eficácia da terapia antibacteriana (BECEIRO *et al.*, 2013).

O surgimento de cepas de enterobactérias “intratáveis” constitui em um problema global e marca o início da era pós-antibiótico (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013;

ZOWAWI *et al.*, 2015). A emergência de cepas bacterianas multirresistentes é consequência de mutações dos micro-organismos e da pressão seletiva decorrente do uso de antibacterianos (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013).

Algumas terapias antibacterianas alternativas vêm sendo propostas para combater a problemática envolvendo a resistência bacteriana e o tratamento de IABs. Dentre estas alternativas estão as terapias com fagos, dispositivos médicos impregnados com antibacterianos, uso de peptídeos antimicrobianos, agentes quelantes, agentes antivirulência entre outros (KOSTAKIOTI *et al.*, 2013). O desenvolvimento de terapias capazes de inibir ou bloquear especificamente fatores de virulência, sem matar a bactéria e nem inibir seu crescimento vem ganhando destaque. Esta nova abordagem possui algumas vantagens, como ampliar o repertório de alvos bacterianos, preservar a microbiota do hospedeiro e diminuir a pressão seletiva o que poderia reduzir a resistência bacteriana. Os fatores de virulência alvos podem ser toxinas, fatores de adesão, fatores envolvidos na formação do biofilme entre outros (CLATWORTHY *et al.*, 2007; RASKO e SPERANDIO, 2010).

Neste contexto, o presente trabalho visa contribuir com o promissor desenvolvimento de terapias antivirulência fornecendo informações importantes sobre mecanismos de virulência relacionados à adesão a superfícies bióticas e abióticas e à formação de biofilme. Vale ressaltar que a literatura possui diversas publicações referentes à resistência bacteriana em cepas do CEC entretanto poucos dados sobre os mecanismos virulências destes micro-organismos estão disponíveis.

VI - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no desenvolvimento desta tese permitem as seguintes conclusões:

- A maioria dos isolados clínicos de *E. hormaechei* subsp. *oharae* avaliados foram oriundos de swabs retais o que comprova que o trato gastrointestinal é um importante reservatório destas bactérias multirresistentes;
- A macrocolônia de *E. hormaechei* subsp. *oharae* 798F gerou diferentes subpopulações as quais apresentaram diferenças na virulência e na resposta à terapia com antibacterianos em *G. mellonella*. Esses achados confirmam a macrocolônia como um bom modelo para avaliar diferenças fenotípicas dentro do biofilme;
- As discrepâncias encontradas entre os resultados de suscetibilidade *in vivo* e *in vitro* apontam para possíveis limitações nos métodos empregados em laboratórios de microbiologia clínica;
- Todas as cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae* avaliadas expressam a fímbria tipo 1 e somente duas expressam a fímbria tipo 3; estas duas cepas foram isoladas do mesmo hospital;
- Meios de cultura ricos em glicose estimulam a formação de biofilme em cepas que expressam a fímbria tipo 3;
- As cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae* possuem uma alta capacidade de adesão às células de bexiga;
- As fímbrias tipo 1 e tipo 3 são essenciais para formação de biofilme. Entretanto, os resultados sugerem que outras fímbrias também estejam envolvidas na adesão às células epiteliais da bexiga;
- A estrutura do operon *fim* identificado nas cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae* é semelhante ao operon de *S. enterica*;
- Em *E. hormaechei* subsp. *oharae* o operon *mrk*, provavelmente, está localizado em um plasmídeo e sua estrutura é semelhante ao operon das cepas de *K. pneumoniae*. A codificação da fímbria tipo 3 por plasmídeos facilita a transmissão horizontal desse fator de virulência entre bactérias de diferentes espécies e gêneros.

VII - REFERÊNCIAS

AGUILAR, C.; VLAMAKIS, H.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, p. 638-43, 2007.

ALLEN, B. L.; GERLACH, G. F.; CLEGG, S. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. **J Bacteriol**, v. 173, p. 916-20, 1991.

ALLEN, W. J.; PHAN, G.; WAKSMAN, G. Pilus biogenesis at the outer membrane of Gram-negative bacterial pathogens. **Curr Opin Struct Biol**, v. 22, p. 500-6, 2012.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 289, p. 321-31, 1980.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. **FEMS Microbiol Rev**, v. 35, p. 901-11, 2011.

ANNAVAJHALA, M. K.; GOMEZ-SIMMONDS, A.; UHLEMANN, A. C. Multidrug-Resistant Enterobacter cloacae Complex Emerging as a Global, Diversifying Threat. **Front Microbiol**, v. 10, p. 44, 2019.

BARNHART, M. M.; CHAPMAN, M. R. Curli biogenesis and function. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 131-47, 2006.

BARTSCH, S. M.; MCKINNELL, J. A.; MUELLER, L. E.; AL., E. Potential economic burden of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in the United States. **Clin Microbiol Infect**, v. 23, p. 48 e9-48 e16, 2017.

BECEIRO, A.; TOMAS, M.; BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? **Clin Microbiol Rev**, v. 26, p. 185-230, 2013.

BENTHALL, G.; TOUZEL, R. E.; HIND, C. K.; TITBALL, R. W.; SUTTON, J. M.; THOMAS, R. J.; WAND, M. E. Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in *Galleria mellonella*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 46, p. 538-45, 2015.

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS Suppl**, p. 1-51, 2013.

BJARNSHOLT, T.; CIOFU, O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; HOIBY, N. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, p. 791-808, 2013.

BOKRANZ, W.; WANG, X.; TSCHAPE, H.; ROMLING, U. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. **J Med Microbiol**, v. 54, p. 1171-82, 2005.

BOLL, E. J.; STRUVE, C.; BOISEN, N.; OLESEN, B.; STAHLHUT, S. G.; KROGFELT, K. A. Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. **Infect Immun**, v. 81, p. 1164-71, 2013.

BURMOLLE, M.; BAHL, M. I.; JENSEN, L. B.; SORENSEN, S. J.; HANSEN, L. H. Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains. **Microbiology**, v. 154, p. 187-95, 2008.

BUSCH, A.; PHAN, G.; WAKSMAN, G. Molecular mechanism of bacterial type 1 and P pili assembly. **Philos Trans A Math Phys Eng Sci**, v. 373, 2015.

BUSCH, A.; WAKSMAN, G. Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 367, p. 1112-22, 2012.

CARVALHO-ASSEF, A. P.; PEREIRA, P. S.; ALBANO, R. M.; BERIAO, G. C.; CHAGAS, T. P.; TIMM, L. N.; DA SILVA, R. C.; FALCI, D. R.; ASENSI, M. D. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, p. 2956-7, 2013.

CARVALHO-ASSEF, A. P.; PEREIRA, P. S.; ALBANO, R. M.; BERIAO, G. C.; TAVARES, C. P.; CHAGAS, T. P.; MARQUES, E. A.; TIMM, L. N.; DA SILVA, R. C.; FALCI, D. R.;

- ASENSI, M. D. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, p. 2475-6, 2014.
- CDC. **Antibiotic resistance threats in the United States**. Centers for Disease Control and Prevention: 1 - 114 p. 2013.
- CHAUDHURI, R. R.; SEBAIHIA, M.; HOBMAN, J. L.; WEBBER, M. A.; LEYTON, D. L.; GOLDBERG, M. D.; CUNNINGHAM, A. F.; SCOTT-TUCKER, A.; FERGUSON, P. R.; THOMAS, C. M.; FRANKEL, G.; TANG, C. M.; DUDLEY, E. G.; ROBERTS, I. S.; RASKO, D. A.; PALLEN, M. J.; PARKHILL, J.; NATARO, J. P.; THOMSON, N. R.; HENDERSON, I. R. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. **PLoS One**, v. 5, p. e8801, 2010.
- CHAVDA, K. D.; CHEN, L.; FOUTS, D. E.; SUTTON, G.; BRINKAC, L.; JENKINS, S. G.; BONOMO, R. A.; ADAMS, M. D.; KREISWIRTH, B. N. Comprehensive Genome Analysis of Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp.: New Insights into Phylogeny, Population Structure, and Resistance Mechanisms. **MBio**, v. 7, 2016.
- CLATWORTHY, A. E.; PIERSON, E.; HUNG, D. T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. **Nat Chem Biol**, v. 3, p. 541-8, 2007.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-22, 1999.
- DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, p. 114-22, 2003.
- DAVIN-REGLI, A.; PAGES, J. M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Front Microbiol**, v. 6, p. 392, 2015.
- DESBOIS, A. P.; COOTE, P. J. Utility of Greater Wax Moth Larva (*Galleria mellonella*) for Evaluating the Toxicity and Efficacy of New Antimicrobial Agents. **Adv Appl Microbiol**, v. 78, p. 25-53, 2012.
- DETHLEFSEN, L.; HUSE, S.; SOGIN, M. L.; RELMAN, D. A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. **PLoS Biol**, v. 6, p. e280, 2008.
- DI MARTINO, P.; CAFFERINI, N.; JOLY, B.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. **Res Microbiol**, v. 154, p. 9-16, 2003.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, p. 167-93, 2002.
- EVANS, M. L.; CHAPMAN, M. R. Curli biogenesis: order out of disorder. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, p. 1551-8, 2014.
- EVANS, M. L.; CHORELL, E.; TAYLOR, J. D.; ADEN, J.; GOTHESON, A.; LI, F.; KOCH, M.; SEFER, L.; MATTHEWS, S. J.; WITTUNG-STAFSHEDE, P.; ALMQVIST, F.; CHAPMAN, M. R. The bacterial curli system possesses a potent and selective inhibitor of amyloid formation. **Mol Cell**, v. 57, p. 445-55, 2015.
- FALAGAS, M. E.; LOURIDA, P.; POULIKAKOS, P.; RAFAILIDIS, P. I.; TANSARLI, G. S. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: systematic evaluation of the available evidence. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, p. 654-63, 2014.
- FELEK, S.; JEONG, J. J.; RUNCO, L. M.; MURRAY, S.; THANASSI, D. G.; KRUKONIS, E. S. Contributions of chaperone/usher systems to cell binding, biofilm formation and *Yersinia pestis* virulence. **Microbiology**, v. 157, p. 805-18, 2011.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, p. 623-33, 2010.

- FRONZES, R.; REMAUT, H.; WAKSMAN, G. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. **EMBO J**, v. 27, p. 2271-80, 2008.
- GIRARD, V.; MOUREZ, M. Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: structural and functional features. **Res Microbiol**, v. 157, p. 407-16, 2006.
- GLAVIS-BLOOM, J.; MUHAMMED, M.; MYLONAKIS, E. Of model hosts and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. **Adv Exp Med Biol**, v. 710, p. 11-7, 2012.
- Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics** Geneva: World Health Organization: WHO Press: 1-7 p. 2017.
- GOTTIG, S.; RIEDEL-CHRIST, S.; SALEH, A.; KEMPF, V. A.; HAMPRECHT, A. Impact of bla_{NDM-1} on fitness and pathogenicity of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 47, p. 430-5, 2016.
- GU, C. T.; LI, C. Y.; YANG, L. J.; HUO, G. C. *Enterobacter xiangfangensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional sourdough, and reclassification of *Enterobacter sacchari* Zhu et al. 2013 as *Kosakonia sacchari* comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 64, p. 2650-6, 2014.
- HARDMAN, A. M.; STEWART, G. S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 74, p. 199-210, 1998.
- HAUSSLER, S.; FUQUA, C. Biofilms 2012: new discoveries and significant wrinkles in a dynamic field. **J Bacteriol**, v. 195, p. 2947-58, 2013.
- HENGGE, R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, p. 263-73, 2009.
- HENGGE, R. The General Stress Response in Gram-Negative Bacteria. In: STORZ, G., HENGGE, R. (Ed.). **Bacterial Stress Responses**. 2. Washington, DC, USA: ASM Press, 2011. cap. 15, p.251–289.
- HOFFMANN, H.; ROGGENKAMP, A. Population genetics of the nomenclotype *Enterobacter cloacae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 5306-18, 2003.
- HOFFMANN, H.; STINDL, S.; LUDWIG, W.; STUMPF, A.; MEHLEN, A.; HEESEMAN, J.; MONGET, D.; SCHLEIFER, K. H.; ROGGENKAMP, A. Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. **Syst Appl Microbiol**, v. 28, p. 196-205, 2005a.
- HOFFMANN, H.; STINDL, S.; LUDWIG, W.; STUMPF, A.; MEHLEN, A.; MONGET, D.; PIERARD, D.; ZIESING, S.; HEESEMAN, J.; ROGGENKAMP, A.; SCHLEIFER, K. H. *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* comb. nov., and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 3297-303, 2005b.
- HOFFMANN, H.; STINDL, S.; STUMPF, A.; MEHLEN, A.; MONGET, D.; HEESEMAN, J.; SCHLEIFER, K. H.; ROGGENKAMP, A. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. **Syst Appl Microbiol**, v. 28, p. 206-12, 2005c.
- HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; MOSER, C.; BASSI, G. L.; COENYE, T.; DONELLI, G.; HALL-STOODLEY, L.; HOLA, V.; IMBERT, C.; KIRKETERP-MOLLER, K.; LEBEAUX, D.; OLIVER, A.; ULLMANN, A. J.; WILLIAMS, C.; BIOFILMS, E. S. G. F.; CONSULTING EXTERNAL EXPERT WERNER, Z. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clin Microbiol Infect**, v. 21 Suppl 1, p. S1-25, 2015.
- HORMAECHE, E.; EDWARDS, P. R. A proposed genus *Enterobacter*. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy** v. 10, p. 71-74, 1960.

- HOSPENTHAL, M. K.; COSTA, T. R. D.; WAKSMAN, G. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. **Nat Rev Microbiol**, v. 15, p. 365-379, 2017.
- HUANG, Y. J.; WU, C. C.; CHEN, M. C.; FUNG, C. P.; PENG, H. L. Characterization of the type 3 fimbriae with different MrkD adhesins: possible role of the MrkD containing an RGD motif. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 350, p. 537-42, 2006.
- Identification of Enterobacteriaceae**. UK Standards for Microbiology Investigations. Public Health England: 1-34 p. 2015.
- JAGNOW, J.; CLEGG, S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. **Microbiology**, v. 149, p. 2397-405, 2003.
- KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 73, p. 310-47, 2009.
- KARLOWSKY, J. A.; LOB, S. H.; KAZMIERCZAK, K. M.; BADAL, R. E.; YOUNG, K.; MOTYL, M. R.; SAHM, D. F. *In Vitro* Activity of Imipenem against Carbapenemase-Positive Enterobacteriaceae: SMART Global Surveillance Program 2008-2014. **J Clin Microbiol**, 2017.
- KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiol Rev**, v. 28, p. 101-12, 2004.
- KISIELA, D. I.; CHATTOPADHYAY, S.; TCHESNOKOVA, V.; PAUL, S.; WEISSMAN, S. J.; MEDENICA, I.; CLEGG, S.; SOKURENKO, E. V. Evolutionary analysis points to divergent physiological roles of type 1 fimbriae in *Salmonella* and *Escherichia coli*. **MBio**, v. 4, 2013.
- KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. Type 1 Fimbriae, Curli, and Antigen 43: Adhesion, Colonization, and Biofilm Formation. **EcoSal Plus**, v. 1, 2004.
- KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial adhesins: function and structure. **Int J Med Microbiol**, v. 290, p. 27-35, 2000.
- KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, p. 2567-72, 2005.
- KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, p. a010306, 2013.
- KREMER, A.; HOFFMANN, H. Prevalences of the *Enterobacter cloacae* complex and its phylogenetic derivatives in the nosocomial environment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, p. 2951-5, 2012a.
- KREMER, A. N.; HOFFMANN, H. Subtractive hybridization yields a silver resistance determinant unique to nosocomial pathogens in the *Enterobacter cloacae* complex. **J Clin Microbiol**, v. 50, p. 3249-57, 2012b.
- KROGFELT, K. A.; BERGMANS, H.; KLEMM, P. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. **Infect Immun**, v. 58, p. 1995-8, 1990.
- LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, A. K.; WERTHEIM, H. F.; SUMPRADIT, N.; VLIEGHE, E.; HARA, G. L.; GOULD, I. M.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.; SO, A. D.; BIGDELI, M.; TOMSON, G.; WOODHOUSE, W.; OMBAKA, E.; PERALTA, A. Q.; QAMAR, F. N.; MIR, F.; KARIUKI, S.; BHUTTA, Z. A.; COATES, A.; BERGSTROM, R.; WRIGHT, G. D.; BROWN, E. D.; CARS, O. Antibiotic resistance-the need for global solutions. **Lancet Infect Dis**, v. 13, p. 1057-98, 2013.
- LEE, C. S.; DOI, Y. Therapy of Infections due to Carbapenem-Resistant Gram-Negative Pathogens. **Infect Chemother**, v. 46, p. 149-64, 2014.

- LEWIS, K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 322, p. 107-31, 2008.
- LIN, C. T.; LIN, T. H.; WU, C. C.; WAN, L.; HUANG, C. F.; PENG, H. L. CRP-Cyclic AMP Regulates the Expression of Type 3 Fimbriae via Cyclic di-GMP in *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS One**, v. 11, p. e0162884, 2016.
- LUTHJE, F. L.; HASMAN, H.; AARESTRUP, F. M.; ALWATHNANI, H. A.; RENSING, C. Genome Sequences of Two Copper-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Copper-Fed Pigs. **Genome Announc**, v. 2, 2014.
- LUTHJE, P.; BRAUNER, A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. **Adv Microb Physiol**, v. 65, p. 337-72, 2014.
- MADSEN, J. S.; RIBER, L.; KOT, W.; BASFELD, A.; BURMOLLE, M.; HANSEN, L. H.; SORENSEN, S. J. Type 3 Fimbriae Encoded on Plasmids Are Expressed from a Unique Promoter without Affecting Host Motility, Facilitating an Exceptional Phenotype That Enhances Conjugal Plasmid Transfer. **PLoS One**, v. 11, p. e0162390, 2016.
- MCBAIN, A. J. Chapter 4 *In Vitro* Biofilm Models. **Advances in Applied Microbiology**, v. 69, p. 99-132, 2009.
- MEIER-KOLTHOFF, J. P.; AUCH, A. F.; KLENK, H. P.; GOKER, M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**, v. 14, p. 60, 2013.
- MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; STEFANI, S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. **Future Microbiol**, v. 7, p. 887-902, 2012.
- MORRILL, H. J.; POGUE, J. M.; KAYE, K. S.; LAPLANTE, K. L. Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. **Open Forum Infect Dis**, v. 2, p. ofv050, 2015.
- NORDMANN, P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. **Med Mal Infect**, v. 44, p. 51-6, 2014.
- NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infect Dis**, v. 9, p. 228-36, 2009.
- NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerg Infect Dis**, v. 17, p. 1791-8, 2011a.
- NORDMANN, P.; POIREL, L.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? **J Antimicrob Chemother**, v. 66, p. 689-92, 2011b.
- NORDMANN, P.; POIREL, L.; WALSH, T. R.; LIVERMORE, D. M. The emerging NDM carbapenemases. **Trends Microbiol**, v. 19, p. 588-95, 2011c.
- O'HARA, C. M.; STEIGERWALT, A. G.; HILL, B. C.; FARMER, J. J., 3RD; FANNING, G. R.; BRENNER, D. J. *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family Enterobacteriaceae formerly known as enteric group 75. **J Clin Microbiol**, v. 27, p. 2046-9, 1989.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu Rev Microbiol**, v. 54, p. 49-79, 2000.
- OHAD, S.; BLOCK, C.; KRAVITZ, V.; FARBER, A.; PILO, S.; BREUER, R.; RORMAN, E. Rapid identification of *Enterobacter hormaechei* and *Enterobacter cloacae* genetic cluster III. **J Appl Microbiol**, v. 116, p. 1315-21, 2014.
- PAAUW, A.; CASPERS, M. P.; LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A.; SCHUREN, F. H.; MONTIJN, R. C.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. Identification of resistance and virulence factors in an epidemic *Enterobacter hormaechei* outbreak strain. **Microbiology**, v. 155, p. 1478-88, 2009.

- PAAUW, A.; CASPERS, M. P.; SCHUREN, F. H.; LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A.; DELETOILE, A.; MONTIJN, R. C.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. **PLoS One**, v. 3, p. e3018, 2008.
- PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **N Engl J Med**, v. 362, p. 1804-13, 2010.
- PROBERT, W. S.; MCQUAID, C.; SCHRADER, K. Isolation and identification of an *Enterobacter cloacae* strain producing a novel subtype of Shiga toxin type 1. **J Clin Microbiol**, v. 52, p. 2346-51, 2014.
- RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. **J Vis Exp**, p. e4392, 2012.
- RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, p. 117-28, 2010.
- REMAUT, H.; TANG, C.; HENDERSON, N. S.; PINKNER, J. S.; WANG, T.; HULTGREN, S. J.; THANASSI, D. G.; WAKSMAN, G.; LI, H. Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. **Cell**, v. 133, p. 640-52, 2008.
- RICHTER, A. M.; POVOLOTSKY, T. L.; WIELER, L. H.; HENGGE, R. Cyclic-di-GMP signalling and biofilm-related properties of the Shiga toxin-producing 2011 German outbreak *Escherichia coli* O104:H4. **EMBO Mol Med**, v. 6, p. 1622-37, 2014.
- ROMLING, U.; KJELLEBERG, S.; NORMARK, S.; NYMAN, L.; UHLIN, B. E.; AKERLUND, B. Microbial biofilm formation: a need to act. **J Intern Med**, v. 276, p. 98-110, 2014.
- ROWE, M. C.; WITHERS, H. L.; SWIFT, S. Uropathogenic *Escherichia coli* forms biofilm aggregates under iron restriction that disperse upon the supply of iron. **FEMS Microbiol Lett**, v. 307, p. 102-9, 2010.
- ROZALES, F. P.; RIBEIRO, V. B.; MAGAGNIN, C. M.; PAGANO, M.; LUTZ, L.; FALCI, D. R.; MACHADO, A.; BARTH, A. L.; ZAVASCKI, A. P. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. **Int J Infect Dis**, v. 25, p. 79-81, 2014.
- SANDERS, W. E., JR.; SANDERS, C. C. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, p. 220-41, 1997.
- SAUER, F. G.; REMAUT, H.; HULTGREN, S. J.; WAKSMAN, G. Fiber assembly by the chaperone-usher pathway. **Biochim Biophys Acta**, v. 1694, p. 259-67, 2004.
- SCHAUFLE, K.; SEMMLER, T.; PICKARD, D. J.; DE TORO, M.; DE LA CRUZ, F.; WIELER, L. H.; EWERS, C.; GUENTHER, S. Carriage of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Plasmids Does Not Reduce Fitness but Enhances Virulence in Some Strains of Pandemic *E. coli* Lineages. **Front Microbiol**, v. 7, p. 336, 2016.
- SCHEMBRI, M. A.; GIVSKOV, M.; KLEMM, P. An attractive surface: gram-negative bacterial biofilms. **Sci STKE**, v. 2002, p. re6, 2002.
- SCHEMBRI, M. A.; KJAERGAARD, K.; KLEMM, P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Mol Microbiol**, v. 48, p. 253-67, 2003.
- SEBGHATI, T. A.; KORHONEN, T. K.; HORNICK, D. B.; CLEGG, S. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. **Infect Immun**, v. 66, p. 2887-94, 1998.
- SERRA, D. O.; HENGGE, R. Stress responses go three dimensional - the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. **Environ Microbiol**, v. 16, p. 1455-71, 2014.
- SERRA, D. O.; RICHTER, A. M.; KLAUCK, G.; MIKA, F.; HENGGE, R. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. **MBio**, v. 4, p. e00103-13, 2013.

- SHAPIRO, J. A. Organization of developing *Escherichia coli* colonies viewed by scanning electron microscopy. **J Bacteriol**, v. 169, p. 142-56, 1987.
- SIEVERT, D. M.; RICKS, P.; EDWARDS, J. R.; SCHNEIDER, A.; PATEL, J.; SRINIVASAN, A.; KALLEN, A.; LIMBAGO, B.; FRIDKIN, S.; NATIONAL HEALTHCARE SAFETY NETWORK, T.; PARTICIPATING, N. F. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 34, p. 1-14, 2013.
- STAHLHUT, S. G.; CHATTOPADHYAY, S.; KISIELA, D. I.; HVIDTFELDT, K.; CLEGG, S.; STRUVE, C.; SOKURENKO, E. V.; KROGFELT, K. A. Structural and population characterization of MrkD, the adhesive subunit of type 3 fimbriae. **J Bacteriol**, v. 195, p. 5602-13, 2013.
- STAHLHUT, S. G.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A. *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbriae agglutinate yeast in a mannose-resistant manner. **J Med Microbiol**, v. 61, p. 317-22, 2012.
- STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, p. 135-8, 2001.
- STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, p. 199-210, 2008.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual review of microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.
- TANGDEN, T.; HICKMAN, R. A.; FORSBERG, P.; LAGERBACK, P.; GISKE, C. G.; CARS, O. Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by *in vitro* time-kill experiments. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, p. 1757-62, 2014.
- THANASSI, D. G.; BLISKA, J. B.; CHRISTIE, P. J. Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, p. 1046-82, 2012.
- TSAI, C. J.; LOH, J. M.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, p. 214-29, 2016.
- VLAMAKIS, H.; CHAI, Y.; BEAUREGARD, P.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, p. 157-68, 2013.
- WALSH, T. R. Emerging carbapenemases: a global perspective. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36 Suppl 3, p. S8-14, 2010.
- WILLIAMS, P.; WINZER, K.; CHAN, W. C.; CAMARA, M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 362, p. 1119-34, 2007.
- WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Sci**, 2016.
- WOLCOTT, R. D.; RHOADS, D. D.; BENNETT, M. E.; WOLCOTT, B. M.; GOGOKHIA, L.; COSTERTON, J. W.; DOWD, S. E. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. **J Wound Care**, v. 19, p. 45-6, 48-50, 52-3, 2010.
- YAMAMOTO, M.; POP-VICAS, A. E. Treatment for infections with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: what options do we still have? **Crit Care**, v. 18, p. 229, 2014.
- YANG, H.; LV, N.; HU, L.; LIU, Y.; CHENG, J.; YE, Y.; LI, J. *In vivo* activity of vancomycin combined with colistin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a *Galleria mellonella* model. **Infect Dis (Lond)**, v. 48, p. 189-94, 2016.
- YONG, D.; TOLEMAN, M. A.; GISKE, C. G.; CHO, H. S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T. R. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a

novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, p. 5046-54, 2009.

ZHU, B.; LOU, M. M.; XIE, G. L.; WANG, G. F.; ZHOU, Q.; WANG, F.; FANG, Y.; SU, T.; LI, B.; DUAN, Y. P. *Enterobacter mori* sp. nov., associated with bacterial wilt on *Morus alba* L. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 61, p. 2769-74, 2011.

ZOGAJ, X.; BOKRANZ, W.; NIMTZ, M.; ROMLING, U. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. **Infect Immun**, v. 71, p. 4151-8, 2003.

ZOWAWI, H. M.; FORDE, B. M.; ALFARESI, M.; ALZAROUNI, A.; FARAHAT, Y.; CHONG, T. M.; YIN, W. F.; CHAN, K. G.; LI, J.; SCHEMBRI, M. A.; BEATSON, S. A.; PATERSON, D. L. Stepwise evolution of pandrug-resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Sci Rep**, v. 5, p. 15082, 2015.