



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

GABRIELA INGRID RODRIGUES DE ARAUJO

**ANÁLISE GENÉTICA DOS DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA À COLISTINA
EM ISOLADO CLÍNICO DE *CITROBACTER FREUNDII***

Recife
2018

GABRIELA INGRID RODRIGUES DE ARAUJO

**ANÁLISE GENÉTICA DOS DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA À COLISTINA
EM ISOLADO CLÍNICO DE *CITROBACTER FREUNDII***

Dissertação apresentada para avaliação do Programa Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Amélia Vieira Maciel

Co-orientador: Dr. Danilo Elias Xavier

Recife
2018

Catálogo na fonte:

Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

A663a Araujo, Gabriela Ingrid Rodrigues de
Análise genética dos determinantes de resistência à colistina em
isolado clínico de *Citrobacter freundii* / Gabriela Ingrid Rodrigues de
Araujo. – 2018.
85 f.; il.

Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em
Medicina Tropical. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndice e anexo.

1. Enterobacteriaceae. 2. Colistina. 3. Resistência a multidrogas.
I. Maciel, Maria Amélia Vieira (orientadora). II. Título.

616.9792 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2019 - 213)

GABRIELA INGRID RODRIGUES DE ARAUJO

**ANÁLISE GENÉTICA DOS DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA À COLISTINA
EM ISOLADO CLÍNICO DE *CITROBACTER FREUNDII***

Dissertação apresentada para avaliação do Programa Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Aprovada em: 12/09/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^a. Maria Amélia Vieira Maciel (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Isabella Macário Ferro Cavalcanti (Examinadora Externa)
Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. João Pacífico Bezerra Neto (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco.

Dedico este trabalho à minha mãe,
Regina Célia Rodrigues, e aos amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade e amparo em todos os momentos de minha vida. Aos meus pais pelo dom da vida, a compreensão e apoio durante toda a caminhada.

Aos meus orientadores, Prof^a Dr^a. Maria Amélia Vieira Maciel e Dr. Danilo Elias Xavier, pela oportunidade.

A todos que fazem parte da coordenação do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, em especial ao Walter Galdino e Neemias Correia pelo pronto atendimento e disponibilidade em minhas solicitações.

Agradeço em especial a Juliana, representante dos alunos de dourado do programa, por todo o auxílio, orientação, carinho e pelas palavras de conforto durante a finalização desse projeto.

Agradeço aos colegas de jornada da 32^a turma de Mestrado PPGMEDTROP em especial a Lucas Portela, Raul Penaforte e Gisele Jucá.

Aos amigos de laboratório Igor Rocha, e especialmente a Carlos Alberto por todo o apoio, companheirismo e amizade.

Aos amigos de sempre Francisco Aires, Fernando Simões, Nadja Oliveira, Tatyane Maciel, Grazielle Santos, Janylle Mayara e Igor Lucena pelos momentos de descontração, conversas fiadas, tempo perdido e por amá-los mais que demais.

Meus sinceros agradecimentos a todos.

RESUMO

O *Citrobacter freundii* está frequentemente envolvido em infecções nosocomiais e tornando-se cada vez mais resistentes as múltiplas drogas, principalmente aos carbapenêmicos. Diante desse quadro, as polimixinas têm sido usadas, como última opção terapêutica. Contudo, o aumento e o inapropriado uso das polimixinas têm provocado a emergência mundial de bactérias resistentes a este fármaco. Neste trabalho visou determinar os fatores envolvidos no desenvolvimento da resistência à colistina no isolado clínico *Citrobacter freundii* C156, através da análise da estrutura molecular e identificação de possíveis mutações, deleções e/ou inserções nos determinantes genéticos e da associação desses eventos genéticos na resistência à colistina apresentada pela cepa *C. freundii* C156. O *C. freundii* C156 foi isolado de paciente de 76 anos do sexo masculino internado em um hospital de referência do Recife-PE. Os determinantes de resistência às polimixinas do *C. freundii* C156 foram determinados através de sequenciamento de alto rendimento e, em seguida, comparados com sequências relacionadas para enterobactérias, através das ferramentas BLAST e suas variantes. Foram feitas análises funcionais através das ferramentas PROVEAN, para predição do comprometimento da função proteica, e PSORT, SMART E TrSSP para inferência de localização celular, domínio e função transportadora e substrato específico, respectivamente. Por fim, foram analisados o perfil plasmidial e os genes adquiridos de resistência para determinação do resistoma do isolado e suas implicações clínicas, através das ferramentas PlasmidFinder e ResFinder. Foi encontrada a única mutação no domínio HAMP do sensor CrrB, A91T na sequência de aminoácidos. A análise do resistoma apresentou genes bem conservados para resistência a aminoglicosídeos, quinolonas e β -lactâmicos compatível com relatos da literatura. A análise plasmidial apresentou plasmídeos com *IncHI2* e *IncHI2A* e ColRNAI cita na literatura com carreadores de genes de resistência compatível com os encontrados na análise dos determinantes de resistência a antimicrobianos. Foi identificado um novo perfil alélico (sequence type - ST) para *C. freundii* C156, ST117, o que confirma a diversidade genética relatada em pesquisas anteriores. Nenhum determinante de resistência a colistina apresentaram alterações significativas nas suas sequências de aminoácidos. Logo se conclui que a resistência a colistina encontrada em *C. freundii* C156 pode estar relacionada à mutação detectada no domínio HAMP do sensor CrrB.

PALAVRAS-CHAVE: Enterobacteriaceae. Colistina. Resistência a multidrogas.

ABSTRACT

Citrobacter freundii is frequently involved in nosocomial infections and the multiple drugs, especially carbapenems, are becoming increasingly resistant. In view of this situation, polymyxins have been used as the last therapeutic option. However, the increase and inappropriate use of polymyxins has caused the worldwide emergence of polymyxin-resistant bacteria. This study aimed to determine the factors involved in the development of resistance to colistin in the clinical isolate *C. freundii* C156, by analyzing the molecular structure and identification of possible mutations, deletions and / or insertions in the genetic determinants and the association of these genetic events in resistance to colistin presented by strain *C. freundii* C156. The strain C156 was isolated from a 76-year-old male patient admitted to a reference hospital in Recife-PE. *C. freundii* C156 polymyxin resistance determinants were determined by high throughput sequencing and then compared to enterobacteria-related sequences through the BLAST tools and their variants. Functional analyzes were performed using the PROVEAN tools to predict protein function impairment and PSORT, SMART and TrSSP for inference of cell location, domain and carrier function, and specific substrate, respectively. Finally, the plasmid profile and acquired resistance genes for the determination of the resistance of the isolate and its clinical implications were analyzed using the PlasmidFinder and ResFinder tools. As result of this the only study mutation in the HAMP domain of the CrrB sensor, A91T in the amino acid sequence, was found. Resistance analysis showed well-conserved genes for resistance to aminoglycosides, quinolones and β -lactams consistent with reports in the literature. Plasmid analysis showed plasmids with *IncHI2* and *IncHI2A* and *ColRNAI* cited in the literature as carriers of resistance genes compatible with those found in the analysis of antimicrobial resistance determinants. A new sequence type (ST) for *C. freundii* C156, ST117 was identified, confirming the genetic diversity reported in previous research. No determinant of resistance to colistin showed significant changes in their amino acid sequences. It is therefore concluded that the resistance to colistin found in strain C156 may be related to the mutation detected in the HAMP domain of the CrrB sensor.

KEYWORDS: Enterobacteriaceae. Colistin. Multidrug-resistance

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – A estrutura do LPS bacteriano.	17
Figura 2 – Estrutura química das polimixinas.	25
Figura 3 – Mecanismo de ação das polimixinas.	27
Figura 4 – Fluxograma dos principais mecanismos de resistência às polimixinas.	30
Figura 5 – Mapa da disseminação mundial do gene <i>mcr-1</i> .	34

Artigo

Figura 1 – Predição dos domínios das proteínas CrrB, CrrA e CrrC	51
---	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos determinado pelo Vitek2. 47
- Tabela 2** – Resultado da montagem do genoma da cepa C156. 48
- Tabela 3** – Comparação do genoma da C156 e os genomas de *Citrobacter freundii* disponíveis no NCBI. 48
- Tabela 4** – Genes de resistência encontrados no genoma do *Citrobacter freundii* C156. 49
- Tabela 5** – Pesquisa de plasmídeos do *Citrobacter freundii* C156 e seus grupos de incompatibilidade. 49
- Tabela 6** – Análise de homologia dos determinantes genéticos envolvidos na resistência a polimixinas. 50
- Tabela 7** – Análise da localização, e funções de transporte e substrato específico das proteínas CrrA, CrrB e CrrC. 51
- Tabela 8** – Variantes alélicas dos loci gênicos do *Citrobacter freundii* C156 utilizados na tipagem por MLST (Multilocus sequence typing). 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BGN	Bactéria e/ou Bacilos Gram-negativa
CAMP	Cationic antimicrobial peptides
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CMS	Colistimetato de sódio
ColR	<i>Colistin-resistant</i>
CRE	<i>Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae</i>
Crr	Colistin resistance regulation
DNA	Ácido Desoxirribonucleótido
ECDC	<i>European Center for Disease Prevention and Control</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde
IS	<i>Insertion Sequence</i>
ITU	Infecção do Trato Urinário
ITR	Infecção do Trato Respiratório
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LB	Meio Luria-Bertain
LPS	Lipopolissacarídeo
Lara4N	4-amino-4-desoxi-L-arabinose
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight
MBL	Metallo- β -lactamase
MCR	<i>Mediterranean colistin resistance</i>
MDR	<i>Multi-drug resistant</i>
MLST	<i>Multi Locus Sequence Typing</i>
NDM	<i>New Delhi Metallo-β—carbapenemases</i>
NF	Não-fermentadores
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PDR	<i>Pandrug resistant</i>
PEtN	Fosfoetanolamina
TCS	<i>Tow-components System</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
EUA	Estados Unidos da América
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
XDR	<i>Extensively drug-resistant</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	ENTEROBACTERIACEAE	16
2.1.1	Enterobacteriaceae: Características gerais	16
2.1.2	<i>Citrobacter freundii</i>	18
2.1.3	Epidemiologia das infecções causadas por membros da Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos	21
2.2	AS POLIMIXINAS	23
2.2.1	Histórico e uso clínico	23
2.2.2	Espectro e mecanismo de ação das polimixinas	26
2.2.3	Mecanismo de resistência	28
2.2.4	Epidemiologia da resistência às polimixinas	33
3	OBJETIVOS	38
3.1	GERAL	38
3.2	ESPECÍFICOS	38
4	MATERIAS E MÉTODOS	39
4.1	ISOLAMENTO DE PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE	39
4.2	SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DO <i>CITROBACTER FREUNDII</i> C156	39
4.3	MONTAGEM DA BIBLIOTECA GENÔMICA	40
4.4	ANÁLISE DOS DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS	41
4.5	ANÁLISE DO RESISTOMA, PERFIL PLASMIDIAL E TIPAGEM POR <i>MULTILOCUS SEQUENCE TYPING</i> (MLST).	42

5	RESULTADOS: ARTIGO – SUBSTITUIÇÃO DE UM ÚNICO AMINOÁCIDO NO SENSOR DE HISTIDINA QUINASE CRRB IMPLICOU NA RESISTÊNCIA À COLISTINA NO ISOLADO CLÍNICO DE <i>CITROBACTER FREUNDII</i>.	43
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE A - ARTIGO - SINGLE AMINO ACID SUBSTITUTION IN THE HISTIDINE KINASE SENSOR CRRB IMPLICATED IN RESISTANCE TO COLISTIN IN CLINICAL ISOLATE OF <i>CITROBACTER FREUNDII</i>.	67
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	85

1 INTRODUÇÃO

O *C. freundii* é frequentemente associado a infecções nosocomiais, principalmente em neonatos e pacientes imunocomprometidos (OUYANG et al., 2018). O rápido aumento da prevalência desse espécime que são resistentes a fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, bem como a todos os β -lactâmicos, incluindo penicilinas, monobactam, cefalosporinas e carbapenêmicos (ZHANG et al., 2012; LIU et al., 2017).

O aumento da incidência de patógenos resistentes aos carbapênemicos levou a utilização das polimixinas como uma opção terapêutica eficaz (BIALVAEI; KAFIL, 2015). Na última década, as polimixinas permaneceram como o fármaco de última escolha no tratamento de infecções causada por bacilos Gram-negativo multidroga resistentes (BGN-MDR) (OLAITAN et al., 2016), contudo, o aumento do uso deste antimicrobiano tem levado ao surgimento da resistência às polimixinas em vários países (PEREZ, 2017), incluindo o Brasil (ROSSI et al., 2016; DALMOLIN et al., 2017).

As moléculas das polimixinas são constituídas por peptídeo cíclico com uma longa cauda hidrofóbica, de natureza catiônica, agem contra a membrana externa da maioria de BNG ao interagir eletrostaticamente com seus fosfolipídios. As polimixinas possuem atividade bactericida frente aos patógenos gram-negativos mais frequentemente associados às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, e outras não fermentadoras (NF), como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (JAYOL, et al., 2015).

Entretanto, para se protegerem do efeito desses fármacos, esses patógenos empregam estratégias que diminuem a interação das polimixinas com suas paredes externas, como modificações do lipopolissacarídeos (LPS), com a substituição dos radicais fosfato do lipídio A por grupos catiônicos como a fosfoetanolamina (PetN) e/ou 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (Lar4N) (OLAITAN et al., 2014; POIREL et al., 2014), e até mesmo deleção do LPS (MOFFATT et al., 2011; LEAN et al., 2014). Outras estratégias relacionadas à resistência às polimixinas por BGN são a expressão de bombas de efluxo, formação de cápsulas e alteração no perfil de proteínas de membrana externa (*outer membrane protein* - OMP) (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014). Esses mecanismos são finamente regulados ao nível molecular, por sistemas de regulação de dois componentes (*Two-components system* - TCS), como o PmrAB e PhoPQ (JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2016) e, mais recentemente, o CrrAB (WRIGHT et al., 2015; CHENG et al., 2016; JAYOL et al., 2017).

As alterações cromossômicas no gene *mgrB* e nos TCS PmrAB e PhoPQ são os mais frequentemente reportados como mecanismo de resistência de Enterobacteriaceae às polimixinas no mundo todo (ROLAIN; OLAITAN, 2016; JAYOL, 2017). Recentemente, um novo TCS foi descrito como relacionado à regulação da resistência à colistina CrrAB (*Colistin resistance regulation* - *crr*), em variantes de *K. pneumoniae* ST258 em um hospital pediátrico nos Estados Unidos da América (WRIGHT et al., 2014), em Taiwan (CHENG et al., 2016), na Grécia, França, Colômbia e África do Sul (JAYOL et al., 2017). Modificações no gene *crrB* são responsáveis pelo aumento da expressão de *crrC*, que regulam a expressão do *pmrC* e do operon *arnT*, através do TCS PmrAB, levando a adição de grupos catiônicos no lipídio A do LPS bacteriano e, conseqüentemente, a resistência à colistina em *K. pneumoniae* (CHENG et al., 2016; JAYOL et al., 2017).

A resistência às polimixinas entre agentes patogênicos transcorreu de maneira gradual na última década (ROLAIN; OLAITAN, 2016). Contudo, a descoberta do gene *mcr-1*, que codifica uma enzima da família das fosfoetanolamina transferase, carregado por plasmídeo conjugativo alarmou a comunidade científica (LI et al., 2016). Em um curto espaço de tempo, o *mcr-1* e suas variantes (*mcr-1.1* e *mcr-1.12*) foram encontrados em diferentes membros da família das Enterobacteriaceae isoladas de diferentes amostras de 40 países nos 5 continentes (GIAMARELLOU et al., 2016). Diversos homólogos foram descritos para o gene *mcr* (*mcr-2*, *3*, *4*, *5*, *6*, *7* e *8*) em membros da Enterobacteriaceae (WANG et al., 2018).

A compreensão desses mecanismos de resistência é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, além de ser vital e oportuno para o desenvolvimento de novas drogas potenciais para o tratamento de infecções causadas por BGN-MDR. Diante do exposto, este trabalho visa à identificação do mecanismo do alto grau de resistência à polimixina exibido pelo isolado clínico de *Citrobacter freundii* C156, oriundo de um hospital terceiro de referência do Recife-PE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

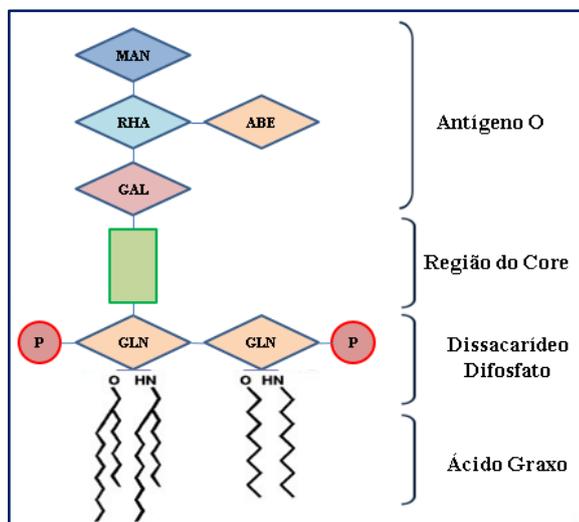
2.1. ENTEROBACTERIACEAE

2.1.1 Características gerais

As enterobactérias constituem uma família de BGN, fermentadores e anaeróbios facultativos, denominada Enterobacteriaceae (KONEMA, 2008). Este agrupamento apresenta uma ampla diversidade de microrganismos que são distribuídos em 60 gêneros, centenas de espécies, subespécies e milhares de sorotipos e biotipos que podem ser identificados através de provas bioquímicas específicas (TORTORA, 2012). Possui *habitat* diversificado, sendo encontrada no solo, na água, nos vegetais e no trato intestinal de animais vertebrados, incluindo o homem (SAMPAIO; GALES, 2016). São morfologicamente caracterizadas por apresentarem-se como bastonetes de tamanho moderados, medindo de 1 – 5 μm , apresentam polimorfismos e podem ou não ter cápsula (XU et al., 2015). Os membros desse grupo podem ser móveis por possuírem flagelos peritríquios, isto é, estas estruturas citoplasmáticas estão distribuídas em torno de toda a célula ou imóveis como observados nos gêneros *Shigella*, *Yersinia* e *Klebsiella* (BROOKS et al., 2014).

A estrutura da parede celular das BGN é caracterizada por uma ou poucas camadas de peptidoglicano e por uma membrana externa. O espaço entre o peptidoglicano e a membrana externa constitui o espaço periplasmático. Por serem mais delgadas, as paredes celulares das BGN's são mais susceptíveis a quebra quando comparadas com a parede das células Gram-positivas (TORTORA, 2012). Outra diferença é ausência do ácido teicóico na composição da parede celular dos BGN's (TORTORA, 2012). Já a membrana externa é formada por uma camada dupla de lipídios, conforme a maioria das membranas biológicas (BROOKS et al., 2014). Acoplado a membrana externa encontra-se o lipopolissacarídeo (LPS) que é constituído por um lipídio na região interna, o lipídio A; um polissacarídeo na região externa, o antígeno O; e na região central dois núcleos, um interno e outro externo, unidos por ligação covalente (figura 1) (KONEMA, 2010). O LPS é um antígeno comum a todas as espécies de BGN é responsável por desencadear uma forte resposta imune no hospedeiro (FERNANDEZ; PEREZ; SOTO, 2013).

Figura 1 - A estrutura do LPS bacteriano



LEGENDA: Componentes da estrutura do lipossacarídeo. Observações: MAN: manose; GAL: galactose; GLN; P: fosfato; O: oxigênio; H: hidrogênio; N: nitrogênio. Fonte: A autora.

Estes bacilos podem ser divididos, de acordo com sua patogenicidade, em três grupos. O primeiro é classificado como de grande patogenicidade sendo encontradas espécies do gênero *Salmonella*, *E. coli* e algumas espécies do *Yersinia*. O segundo grupo é classificado por apresentar patogenicidade incerta, sendo encontrados 17 gêneros da Enterobacteriaceae, com destaque para *Enterobacter* e *Providencia*. E por fim, o dos patógenos oportunistas, onde se incluem os gêneros *Citrobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Shigella*, *Morganella* e *Edwardsiella* (AGUAYO et al., 2016). Outra classificação é baseada na associação de bactérias de origem fecal, os coliformes. O grupo dos coliformes fecais ou termotolerantes é formado pelos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. É importante indicador de contaminação, se reproduzindo ativamente em temperatura acima de 44 °C e fermentando a lactose em 48 horas (BARON et al., 2016).

Os BGN's podem ocasionar infecções intestinais e extra-intestinais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). As bactérias que causam infecções intestinais são classificadas em enteropatogênicas e inclui a *E. coli*, todos os sorotipos do gênero *Shigella*, quase todos os sorotipos de *Salmonella* e alguns sorotipos do *Yersinia*. Alguns estudos sugerem que os gêneros *Citrobacter*, *Providencia* e *Haffnia* podem ser enteropatogênicas (CANNATELLI et al., 2014). As bactérias, pertencentes à Enterobacteriaceae, são responsáveis por mais 50%

dos casos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), sendo a *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. os mais frequentes, e mais recentemente o *Citrobacter* spp. *Serratia marsescens* vêm se destacando em surtos na clínica médica em todo o mundo (GIAMARELLOU et al., 2016).

2.1.2 *Citrobacter freundii*

O gênero *Citrobacter* foi designado em 1932 por Werkman e Gillen, sendo o *Citrobacter freundii* a espécie modelo (KO et al., 2015). Os membros desse gênero são bacilos Gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, que podem utilizar citrato como única fonte de carbono (por isso, a nomenclatura do gênero), além de serem móveis devido à presença de flagelos peritríquios (JANDA et al., 1994). Para diferenciação de outros membros da família Enterobacteriaceae são utilizadas a incapacidade das citrobactérias em produzirem acetilmetilcarbinol a partir da metabolização da glicose (reação de Voges-Proskauer negativa) e a ausência de lisina descarboxilase (KONEMA, 2010). Até o presente momento, 13 espécies foram descritas para o gênero, incluindo as identificadas recentemente *C. bitternis* (KO et al., 2015), *C. europaeus* (RIBEIRO et al., 2017a) *C. portucalensis* (RIBEIRO et al., 2017b). A diferenciação dentro do gênero *Citrobacter* pode ser feita através do perfil bioquímico e/ou da técnica de ionização e dissorção a laser assistida por matriz pelo tempo de voo (*Matrix-assisted laser desorption/ionization – time off light – MALDI-TOF*). As relações filogenéticas baseadas no gene constitutivo 16S RNAr para o *Citrobacter* possui resolução limitada apesar de discriminar os membros do gênero em grupos como sugerido por Warren et al (2000).

O *Citrobacter freundii* é um patógeno oportunista sendo comumente encontrado colonizando o trato intestinal de animais vertebrados, incluindo o homem (ARANA et al., 2017; Villa et al., 2017). Esse espécime também é, frequentemente, isolado de ambientes diversificados como alimentos, água, esgoto e solo (LIU et al., 2017; RIBEIRO et al., 2017a). O *C. freundii* tem sido associado a um amplo espectro de infecções envolvendo os tratos gastrointestinal, respiratório e urinário, infecções em feridas, abscessos, diarreias e em casos graves como septicemias e meningite, em neonatos e endocardites (MOHANTY et al., 2006; SAMONIS et al., 2009; LIU et al, 2018), especialmente em grupos de alto risco, como idosos e adultos imunocomprometidos ou/e acometidos de doenças crônicas (ZANG et al., 2008;

ARANA et al., 2017). O *C. freundii* é a espécie do gênero *Citrobacter* mais comumente isolada em ambientes hospitalares, seguida por *C. youngae* e o *C. braakii* (LIU et al., 2017).

A emergência da disseminação de espécies de *Citrobacter* tem coincidido com o isolamento de *C. freundii* frequente do aumento da resistência a múltiplas drogas. Liu e colaboradores (2017) afirmaram que essa frequência sugere que tanto as cepas ambientais quanto as hospitalares possam ser reservatórios de determinantes de resistência a antimicrobianos. Leski e colaboradores (2016) relataram um número surpreendentemente alto de isolados de *C. freundii* resistentes a múltiplas drogas. Relatos sobre a diversidade genética, perfil de resistência antimicrobiana, fatores de virulência apresentadas por esse patógeno foram conduzidos na África (LESKI et al., 2016) e China (LIU et al., 2017; LIU et al., 2018).

O perfil de resistência a antimicrobianos mostrou uma prevalência de *C. freundii* produtores de β -lactamases de espectro estendido (*Extended-spectrum beta-lactamase* -ESBL) em torno de 0.5 a 36% (PRAHARAJ et al., 2016). Os fenótipos mais relatados são a presença de genes de resistência como *bla_{CTX}*, *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* (LIU et al., 2017; LIU et al., 2018). A frequência desses genes é diferente entre as cepas isoladas de ambiente hospitalares quando comparada com a frequência em ambiente comunitário (LIU et al., 2017). Isto sugere uma alta capacidade do *C. freundii* de ser aquisição e disseminação de determinantes genéticos de resistência (PRAHARAJ et al., 2016; LIU et al., 2017; LIU et al., 2018).

No tangente a virulência, esses agentes patológicos adquiriram traços de virulência que causam intoxicações alimentares e diarreias em seres humanos (BAI et al., 2012). As principais toxinas associadas a casos de infecções diarreicas causadas por *C. freundii* são as toxinas do tipo *Shiga*, toxinas termoestáveis e a toxina homóloga a subunidade B das toxinas da cólera (BAE et al., 2010).

No curso da história, espécies do gênero *Citrobacter* foram primeiramente descritas em surto de gastroenterite em 1946. Contudo as primeiras discussões detalhadas a respeito dos aspectos clínicos das infecções por estes patógenos ocorreram em 1967 (PEPPERELL et al., 2002). Apesar de pouco frequentes, as infecções por espécies de *Citrobacter* são clinicamente relevantes na grande maioria dos casos, principalmente nas infecções polimicrobianas (HUANG et al., 2015).

Em um estudo do perfil de susceptibilidade do *C. freundii* realizado através de estudo coorte, entre os anos de 1994 a 2006, conduzido em um hospital terciário da Grécia, esta espécie se mostrou sensível à colistina (100%), fosfomicina (100%), imipenem (97.4%), gentamicina (89.5%), nitrofurantoina (89.5%), ciprofloxacina (80.6%), e cefepima (73.7%) (SAMONIS et al., 2009). Contudo, estudos recentes mostram que *C. freundii* tem se tornado resistente aos antimicrobianos de uso comum, sendo um grande desafio para o tratamento clínico de infecções causadas por esse patógeno (LIU et al., 2016).

No cenário atual, isolado clínico de *C. freundii* tem sido relatado com maior frequência associado a infecções graves e apresentando um alto nível de resistência aos carbapenêmicos, último fármaco de escolha no tratamento de infecções causadas por BGN-MDR. Relatos de *C. freundii* produtores de carbapenemases têm sido frequentemente encontrados em países europeus, dos continentes Africano e Asiático e nos Estados Unidos da América (EUA) (HUANG et al., 2015).

Entre as enzimas produzidas por esta espécie estão as da classe B (Metallo- β -lactamase): VIM, IMP e variantes da NDM (PETER et al., 2014); de classe A (KPC-2 e KPC-3) (GOMEZ-GIL et al., 2010; LI et al., 2011); além das pertencentes a classe D (OXA-48 e OXA-181) (POIREL et al., 2011; GAIBANI et al., 2013). Mais recentemente, foi identificada uma nova carbapenemase da classe D de *C. freundii* isolado de águas residuais hospitalares, a OXA-372, que tinha implicações clínicas importantes, uma vez que apresentou ação contra os carbapenêmicos e as cefalosporinas de amplo espectro (ANTONELLI et al., 2015).

Na China, a carbapenemase NDM-1 reportada em *C. freundii* estava no mesmo contexto genético de NDM-1 reportadas em isolados clínicos de *E. coli*, ambos os isolados oriundo do mesmo paciente (HUANG et al., 2015). A transferência de determinantes gênicos de resistência mediados por plasmídeo pode causar uma disseminação rápida desses genes entre espécies de gêneros relacionados. Essa transferência pode ser facilitada pelo fato de *C. freundii* está implicado em infecções polimicrobianas, geralmente em associação com outras espécies de enterobactérias MDR, como *K pneumoniae* e *E. coli* (HUANG et al., 2015; ANTONELLI et al., 2015).

Em um estudo retrospectivo conduzido com isolados clínicos de um banco de dados de BGN coletados nos últimos dez anos em um hospital escolar em São Paulo, maior metrópole brasileira, foi descrita a presença de *C. freundii* resistente à colistina (ROSSI et al.,

2016). Contudo, a base para essa resistência em *C. freundii* não foi pesquisada, pois este estudo teve caráter exclusivamente epidemiológico. Rossi et al. (2016) observaram a presença de cepas resistentes às polimixinas e sensíveis aos carbapenêmicos, e inferiram que a sensibilidade aos carbapenêmicos poderia implicar na possível subnotificação dos isolados encontrados. As normas para a investigação clínica da resistência às polimixinas foram estabelecidas a partir de 2006, em teste de diluição para *A. baumannii* (CLSI, 2006), e em 2007 para *P. aeruginosa*, pelo método de difusão em disco (CLSI, 2007). Contudo, o EUCAST (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/enterobacteriaceae) tem a padronização usada para breakpoint para as polimixinas. Este fato se deve em parte pela raridade de artigos que fazem uma associação clínico-laboratorial do uso das polimixinas e devido à polimixinas ser utilizadas como fármaco de última escolha no tratamento de infecções graves causadas por BNG-MDR (GALES; JONES; SADER, 2011; GIRARDELLO; GALES, 2012).

2.1.3 Epidemiologia das infecções causadas por membros da enterobacteriaceae resistentes ao carbapenêmicos

A família Enterobacteriaceae inclui espécies causadoras de uma ampla variedade de doenças e vem se tornando um grande desafio para a prática clínica devido à emergência e disseminação de linhagens bacterianas resistentes a múltiplas drogas (MDR), com severas implicações à saúde pública e à sociedade (ABBOUD et al., 2016).

Os β -lactâmicos, classe do qual faz parte os carbapenêmicos, são os principais antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções causadas por essas bactérias que protagonizam diversos surtos de IRAS (JAMAL; ALBERT; ROTIMI, 2016; WU et al., 2016). No ano de 2013, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) apontou três microrganismos que representavam uma ameaça à saúde pública: Enterobacteriaceae resistente aos carbapenêmicos (CRE), *Neisseria gonorrhoeae* resistente a drogas e *Clostridium difficile* (ZOWAWI et al., 2015).

As carbapenemases do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) tem sido mais frequentemente observada desde sua descrição em 1996 no leste do Estados Unidos da América (EUA) (LEE et al., 2016). Essa família enzimática possui muitas variantes distintas sendo as mais bem caracterizadas as do tipo KPC-2 e KPC-3 (ADAMS-SAPPER et al.,

2015). As KPCs são principalmente codificadas por plasmídeos e as bactérias que carregam esses genes são susceptíveis a apenas alguns antimicrobianos como colistina, tigeciclina e aminoglicosídeos. Essa baixa susceptibilidade diminui a eficácia do tratamento clínico e aumenta consideravelmente a mortalidade (ADLER et al., 2015).

A disseminação das enzimas tipo KPCs é mundial e varia geograficamente (LEE et al., 2016). Estudos relatam a propagação endêmica dessa enzima no continente Europeu, Asiático, Oceania e nas Américas (MUNOZ-PRINCE et al., 2013; NORDMANN; POIREL, 2014). No Brasil, *K. pneumoniae* produtoras de KPC é comumente reportada, sendo a carbapenemase mais prevalente (QUILES et al., 2015).

As β -lactamases de classe B incluem as metalo- β -carbapenemases, ou seja, requerem zinco ou outro metal pesado para sua catálise. As β -lactamases de classe B possui amplo espectro de substrato e podem hidrolisar praticamente todos os β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos (FENG et al., 2015). As carbapenemases de classe B incluem as VIM, PIM e as NDM (JEON et al., 2015). A enzima *New Delhi* Metalo- β -carbapenemases (NDM) são um grupo emergente e uma das clinicamente mais significativas. A NDM-1 foi descrita pela primeira vez em 2008 de *K. pneumoniae* e *E. coli* isoladas de uma paciente na Suécia que havia retornado de uma viagem à Índia (GIANI et al., 2013). Até o presente, mais de 15 variantes foram detectadas em CRE, a maioria originária da Ásia e apresentam pouca identidade com as demais β -carbapenemases (NORDMANN; POIREL, 2014).

Desde 2008, houve uma rápida disseminação mundial de *K. pneumoniae* produtoras de NDM e são consideradas endêmicas na Índia, Paquistão e Bangladesh (NORDMANN; POIREL, 2014). O movimento de pacientes entre países pode ser um fator de disseminação internacional de CRE (BERRAZEG et al., 2015). Um estudo epidemiológico feito no Canadá aponta que *K. pneumoniae* produtoras de NDM foram importadas da Índia (PEIRANOS et al., 2014). Este estudo é corroborado por relatos de CRE produtoras de NDM no México (BARRIOS et al., 2014) Guatemala (PASTERAN et al., 2012) e Brasil (QUILES et al., 2015).

As β -lactamases da classe D são denominadas oxacilinas (OXA) devido a uma rápida ação sobre as isoxazolilpenicilinas que as benzilpenicilinas (JEON et al., 2014). Já foram identificadas mais 400 β -lactamases de classe D, contudo, apenas 12 variantes possuem atividades carbapenemases. A OXA-48 é a mais eficiente na hidrólise do imipenem e uma

das mais prevalentes. Esta enzima foi descrita pela primeira vez em *K. pneumoniae* na Turquia em 2003 (JEON et al., 2014). Desde 2003, a OXA-48 tem sido relatada em diversos países dos cinco continentes (LEE et al., 2016).

Walsh et al. (2005) fizeram uma revisão sobre as metalo- β -lactamases (MBL), apesar de o enfoque ser nas características bioquímicas e genéticas, os autores apontaram que a propagação contínua de carbapenemases em todo o mundo resultaria em uma catástrofe clínica e poderia causar uma futura crise de saúde pública. A disseminação de genes codificadores de carbapenemases é mediada pela mobilização de elementos genéticos móveis, sendo, na última década, responsável pelo aumento considerável da resistência aos carbapenêmicos entre isolados clínicos de Enterobacteriaceae e outros Gram-negativos (FOMDA et al., 2014; HUANG et al., 2015).

As β -carbapenemases da classe C são representadas ACT-1, CMY-2, CMY-10 e ADC-68. As CMY-2 e ACT-1 conferem resistência aos carbapenêmicos, principalmente ao ertapenem, apenas quando combinadas com defeitos na permeabilidade da membrana, devido a sua baixa eficiência catalítica (LEE et al., 2016). A CMY-10 foi a primeira carbapenemase de classe C codificada por plasmídeo a ser identificada. Esta enzima também inativa cefalosporina de espectro estendido (MAMMERI et al., 2010).

No Brasil, o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos entre espécies de Enterobacteriaceae é a produção de carbapenemases. Estas enzimas têm sido amplamente disseminadas durante a última década em todo território nacional, sendo, atualmente, o mecanismo de resistência mais frequente no país (96,2%) (SAMPAIO; GALES, 2016).

2.2 AS POLIMIXINAS

2.2.1 Histórico e uso clínico

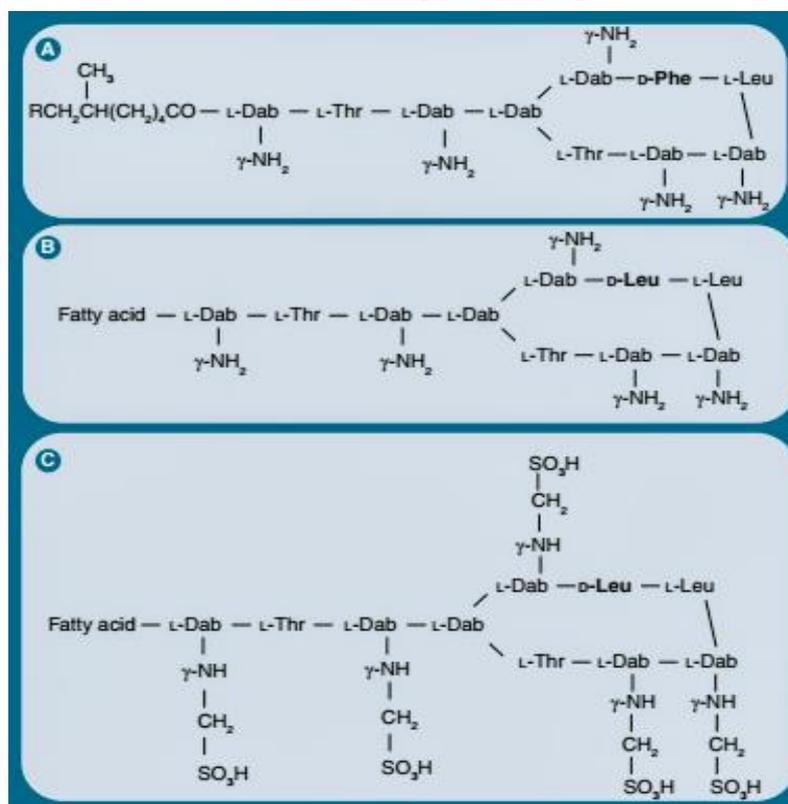
As polimixinas são antimicrobianos polipeptídicos cíclicos policatiônicos descobertos na final da década de 1940 por pesquisadores ingleses e norte-americanos (LI et al., 2005). Estes fármacos são sintetizados como produtos do metabolismo de *Bacillus polymyxa* (família Bacillaceae), um bacilo Gram-positivo aeróbio isolado do solo. Foram introduzidos, na prática clínica, entre meados da década de 1950 e início da década de 1960

(ZAVASCKI et al., 2007). Durante os anos de 1960, estes fármacos foram opções terapêuticas contra infecções graves por BNG's, principalmente em pacientes com doenças crônicas como a fibrose cística. Contudo, a administração, por tempo prolongado, das polimixinas foi associada com altas taxas de efeitos adversos, tanto renais quanto neurológicos (FALAGAS; KASIAKOU; SARAVOLATZ, 2005). Assim, estes compostos foram gradativamente retirados da prática clínica, sendo substituídas por cefalosporinas de amplo espectro e aminoglicosídeos que apresentavam menor toxicidade e mesmo espectro de ação (MENDES; BURDMANN, 2009).

Entretanto, o surgimento de bacilos Gram-negativos com resistência adquirida a quase todos os agentes a escassez de novos antimicrobianos para combater essas bactérias resistentes, levaram ao ressurgimento das polimixinas, como última opção de tratamento de infecções graves (GIAMARELLOU, 2010). Esta classe de antibióticos consiste em cinco compostos quimicamente correlacionados, polimixinas A, B, C, D e E (colistina). No entanto, apenas as polimixinas B e E são utilizadas na terapêutica, devido a apresentarem menor toxicidade em comparação com as demais (GIRARDELLO; GALES, 2012).

A colistina é composta por um heptapeptídeo cíclico e uma cadeia lateral triacilada no terminal amino. Sua cadeia de aminoácido é composta por resíduo de D-Leucina, L-treonina e ácido L- α - γ -diaminobutírico (FALAGAS; KASIAKOU, 2006). A polimixina B possui a mesma estrutura, apenas diferenciando da colistina por conter um resíduo de D-fenilalanina no lugar de D-leucina (figura 2) (FALAGAS; KASIAKOU, 2006; GIRARDELLO; GALES, 2012).

FIGURA 2: Estrutura química das polimixinas



LEGENDA: Em A, ver-se estrutura da polimixina B1 e B2; em B a estrutura da colistina A e B; e em C a estrutura do colistimetato de sódio A e B. Fatty Acid: Para a colistina A, Colistimetato de sódio A e poliximanas B1 e B2 é o ácido 6- metiloctanoico, para Colistina B e Colistinetato de sódio B é o ácido 6-metileptanoico. Dab significa ácido α,γ -diacilbutirico; Leu: significa leucina; Thr: treonina; e γ representa os grupos amino envolvidos na ligação do peptídeo ao lipídio A. Fonte: KWA et al., 2007.

Tanto a polimixina B quanto a colistina (polimixina E) possuem atividade bactericida contra um amplo espectro de bactérias Gram-negativas, sendo sua sensibilidade limitada para *Burkoderia cepacia*, *Serratia* spp., *Proteus* spp. indol-positivo e *Porteus mirabilis* (GIAMARELLOU, 2010). Estes fármacos não apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos (PARUSSOLO; GARCIA; TOGNIM, 2014). A colistina é comercializada como uma pró-droga, o colistimetato de sódio, usado parentalmente e por inalação. E o sulfato de colistina usado oralmente para descontaminação intestinal e topicamente como um pó para infecções da pele. Descobriu-se que o colistimetato de sódio é menos tóxico e tem menos efeitos colaterais indesejáveis do que a colistina, mas também é menos potente. A polimixina B está disponível para uso clínico como sulfato de polimixina B e é usada via parenteral, topicamente (instilação oftálmica e ótica), via intratecal, por inalação e como solução de irrigação (KWA et al., 2007).

Contudo, as informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica das polimixinas é muito limitada, devido principalmente ao hiato de tempo entre a retirada desses fármacos (início da década de 1970) e ressurgimento na terapêutica clínica (final dos anos 1990). Aliado a isso, a resistência às polimixinas, incluindo a heterorresistência, vem aumentando no mundo todo recentemente (JAYOL et al., 2016). Isto torna urgente o aumento do conhecimento acerca da farmacologia desses medicamentos para aperfeiçoar seu uso clínico e diminuir o potencial desenvolvimento de resistência (KUO et al., 2016).

2.2.2 Espectro e mecanismo de ação das polimixinas

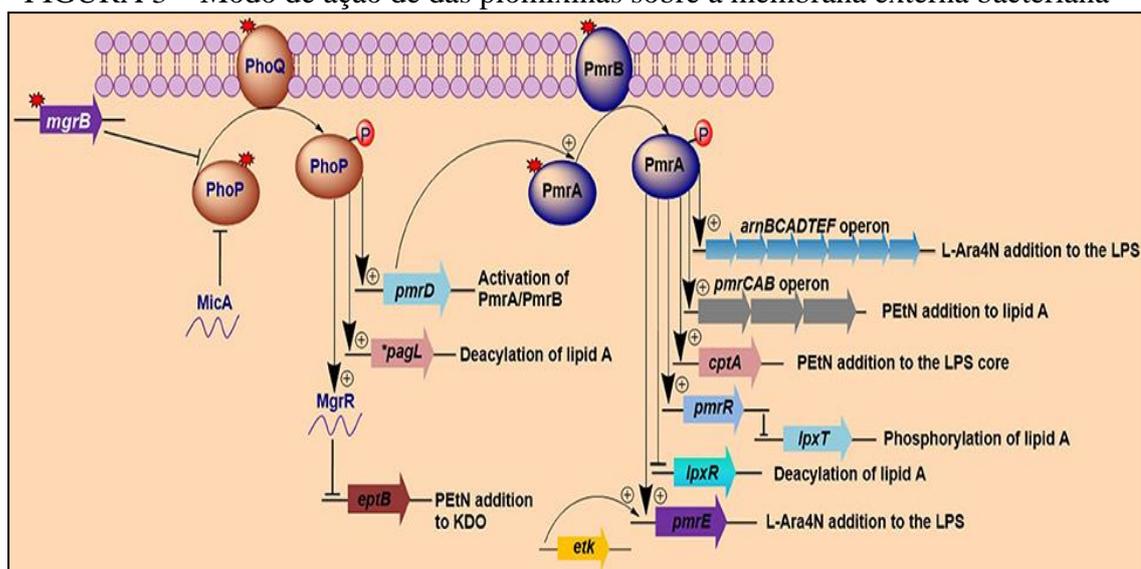
As polimixinas tem espectro de ação contra uma variedade de bactérias Gram-negativas, incluindo espécies clinicamente relevante, principalmente da família das enterobactérias e bacilos não-fermentadores como a *P aeruginosa* e *A baumannii* (THEURETZBACHER et al., 2014). Existem espécies que possuem susceptibilidade variada para as polimixinas como a *Stenotrophomonasmaltophilia* e *Campylobacter* spp. e espécies de *Bartonella* spp. que apresenta susceptibilidade “borderline” (ORTWINE et al., 2015). Espécies do complexo *Burkholderia cepacia* e *Burkholderiapseudomallei* são intrinsecamente resistentes às polimixinas (GIAMARELLOU et al., 2016).

Entre os membros das Enterobacteriaceae, espécies de *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganellamorganii* e *Serratiamarcescens* são intrinsecamente resistentes. Por lado, representantes de enterobactérias de interesse clínico relevante são, normalmente, susceptíveis às polimixinas, como é o caso de espécies do gênero *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* e *Escherichia coli* (ROSALES et al., 2018).

As polimixinas são ativas também contra *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* e *Legionella pneumophila*. Estudos apontam também que estes polipeptídeos antimicrobianos são ativos contra cepas patogênicas de *Neisseria*, tanto meningococos quanto gonococos (GIAMARELLOU et al., 2016). Já a *Moraxella catarrhalis*, *Helicobacterpylori*, espécies dos gêneros *Vibrio* e *Brucella* apresentam mecanismos intrínsecos de resistência às polimixinas. As polimixinas não apresentam ação bactericida contra bactérias Gram-negativas e anaeróbias (RHUOMA et al. 2016). Possui atividade bactericida rápida e mecanismos de ação semelhante a detergente (GIAMARELLOU et al., 2016). Este mecanismo é idêntico tanto para a polimixina B quanto para colistina (GIAMARELLOU et al., 2016)

O mecanismo canônico de ação das polimixinas tem como sítio inicial a membrana externa da célula bacteriana. A cadeia de ácido graxo das polimixinas interage com LPS bacteriano contribuindo para o acoplamento da polimixinas na membrana externa. Em seguida, ocorre a ligação ao lipídio A, porção do LPS (ZAVASCKI et al., 2007). Esta ligação promove o deslocamento competitivo dos íons cálcio (Ca^{+2}) e magnésio (Mg^{+2}) que são responsáveis por formar pontes com o grupo fosfato do lipídio A e estabilizar o LPS na membrana externa, que como as membranas biológicas possui estrutura “fluida”. Este deslocamento causa um efeito físico-químico que leva a uma instabilidade do LPS com formação de poros na membrana externa. Estes poros permitem a passagem de uma variedade de moléculas, incluindo compostos hidrofóbicos e pequenas proteínas e, conseqüentemente, morte da célula bacteriana (figura 3) (ZAVASCKI et al., 2007).

FIGURA 3 – Modo de ação de das plomixinas sobre a membrana externa bacteriana



Observação: LPS: lipopolissacarídeo. Fonte: OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014.

Estudos com eletromicroscopia mostram que a membrana celular, após a ação inicial das polimixinas, fica parcialmente danificada e que o conteúdo citoplasmático extravasa em forma de fibras, através dos poros. Após a ação inicial das polimixinas sobre o LPS, há a absorção da molécula da polimixina em um fenômeno descrito como absorção autoprovocada (ZAVASCKI et al., 2007).

Outro mecanismo antimicrobiano importante implicado à ação das polimixinas é a neutralização do efeito da endotoxina no organismo (POIREL et al., 2017). A endotoxina de

patógenos Gram-negativos corresponde a molécula do lipídio A. O mecanismo exato de ação ainda não está totalmente elucidado. Contudo, estudos relatam que a habilidade das polimixinas de ligarem-se ao lipídio A e neutralizar o LPS podem estar relacionados a esse efeito antitoxina desses fármacos (GIAMARELLOU et al., 2016). Por fim, outro modo de ação é a inibição de enzimas respiratórias na membrana interna das bactérias, principalmente, a oxireductase NADH quinone tipo 2 (NAD-2) (POIREL et al., 2017).

2.2.3 Mecanismos de resistência

Os mecanismos de resistência às polimixinas podem ser divididos em adquiridos, processos mutacionais em genes reguladores da cascata de síntese do lipopolissacarídeo (LPS) e genes plasmidiais, como MCR-1, ou naturais, por mecanismos intrínsecos de adaptação a estímulos ambientais adversos (BERNAL et al, 2015; SAMPAIO; GALES, 2016). O primeiro caso de Enterobacteriaceae resistente a colistina data o ano de 2004 (GIAMARELLOU et al., 2016).

Esses mecanismos de resistência ainda não estão totalmente elucidados (CANNATELLI et al., 2014). Contudo, é sabido que modificações do LPS têm sido implicadas nos casos de resistência à colistina em bactérias Gram-negativas (JAYOL et al., 2014). A principal modificação ocorre por diversas vias, e inclui a adição de grupos catiônicos ao LPS que leva a uma redução da carga global negativa dessa molécula e, conseqüentemente, inibe a interação das polimixinas (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014). Há relatos descrevendo modificações nas cadeias acil e, até, a perda total do LPS, além de hiperprodução de cápsula, inibição da expressão e/ou mutações deletérias nos genes de porinas e superexpressão de sistema de bomba de efluxo (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2016). Até o presente, apenas um mecanismo transferível por plasmídio foi descrito na literatura, a maioria dos mecanismos são cromossômicos o que implicava, até recentemente, em uma baixa incidência da resistência às polimixinas (CANNATELLI et al., 2014).

A aquisição de resistência às polimixinas tem sido observada em diversos gêneros da família Enterobacteriaceae, incluindo bactérias de interesse clínico como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichiacoli*, subtipos *Salmonella enterica* e *Enterobacter aerogenes* (GIAMARELLOU et al., 2016).

Similar ao que é observado em cepas naturalmente resistentes às polimixinas, a adição de fosfoetanolamina (PEtN) e/ou de 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (Lara4N) no LPS tem sido implicado na resistência a este antimicrobiano na família Enterobacteriaceae (JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2016). Diversos mecanismos genéticos estão envolvidos na adição de grupos catiônicos ao LPS (KAYE et al., 2016). Esse repertório inclui genes e operons diretamente envolvidos na codificação de enzimas que são responsáveis pela síntese ou adição dos grupos modificadores da carga global no LPS (QUESADA et al., 2015).

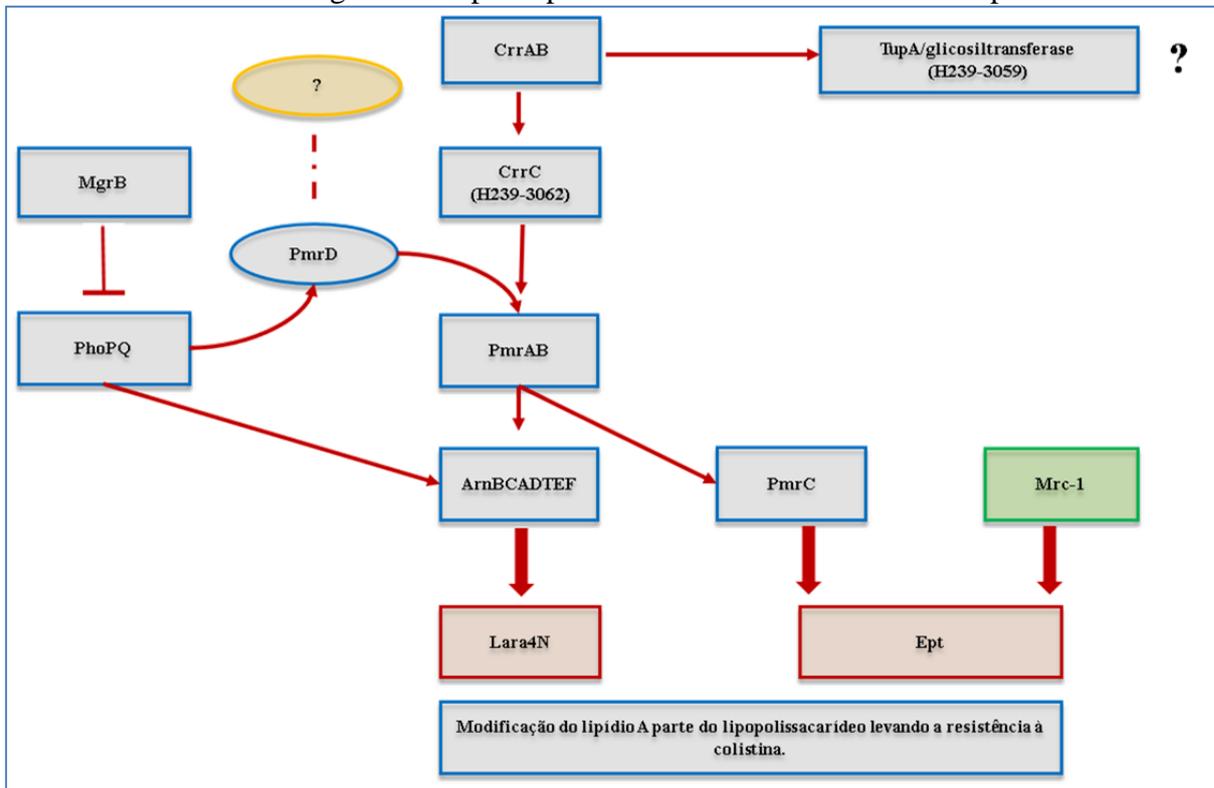
Entre um dos genes que codificam enzimas modificadoras do LPS citado na literatura, há o *pmrC* (JAYOL et al., 2014). Este gene faz parte do operon *pmrCAB*, e constitui uma fosfoetanolamina transferase, também denominado de *eptA*, é responsável pela adição PEtN aos grupos fosfatos do núcleo interno do lipídio A, porção do LPS. Este operon é regulado pelo regulador de resposta PmrA, também conhecida como BasR (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014). Este regulador é ativado pela proteína sensora quinase PmrB, também denominada de BasS, formando um sistema de dois componentes (*two-component system* - TCS) responsáveis pela regulação de diversos genes e operon envolvidos na modificação do LPS, entre esses está o operon *pmrHFIJKLM* (CANNATELLI et al., 2017).

O sistema de dois componentes PmrAB responde a estímulos ambientais como mudanças nos níveis de ferro e de alumínio e pH baixo, em torno de 5.5 (JAYOL et al., 2016). Esse TCS é composto por uma proteína tirosina quinase (PmrB) e pelo regulador de resposta PmrA. A PmrB é polipeptídeo que possui quatro domínios. O domínio sensor transmembrana responsáveis pela captação do estímulo ambiental. O HAMP responsável pela comunicação entre o Sensor e o domínio tirosina quinase (CANNATELLI et al., 2017). Este último, a tirosina quinase, está envolvido na auto-fosforilação de PmrB e da transferência do fosfato inorgânico para a PmrA. E por fim, um domínio fosfatase ligado à tirosina quinase e responsável pela desfosforilação de PmrA (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2016).

O mecanismo molecular canônico desse TCS é dado pela auto-fosforilação de PmrB respondendo a estímulo do domínio sensor transmembranar, em seguida fosforila de PmrA (CHEN; GROISMAN, 2013). PmrA ativada promove a transcrição dos operon *pmrCAB* e *pmrHFIJKLM* e do gene *pmrE* envolvidos na modificação do LPS. Findando o estímulo, a PmrB pelo domínio fosfatase desfosforila PmrA, em um fino controle da resposta gênica a

adaptação e sobrevivência da célula bacteriana a ambientes hostis (figura 4) (CANNATELLI et al., 2014).

FIGURA 4 – Fluxograma dos principais mecanismos de resistência às polimixinas



Fonte: Fluxograma modificado de BARON et al. 2016.

Mutações específicas nos genes *pmrB* e *pmrA* foram implicadas como responsáveis pela resistência às polimixinas em espécies de enterobactérias, tais como *K.pneumoniae*, *E.aerogenes* e *S.enterica* (CANNATELLI et al., 2014). As mutações nestes genes resultam na ativação constitutiva desse operon e superexpressão dos genes regulados por esse TCS (JAYOL et al., 2014).

O TCS PhoPQ tem sido apontado também como responsável pela resistência às polimixinas (MILLER et al., 2011). O TCS PhoPQ codificada duas proteínas, o sensor tirosina quinase, PhoQ, e o regulador de resposta PhoP. Como o PmrAB, o PhoPQ responde a estímulo ambiental como níveis baixos de magnésio (Mg^{+2}) e pH ácidos (OLAITAN et al., 2014). Tanto o PmrAB quanto PhoPQ estão normalmente ativos quando a bactéria é fagocitada por macrófagos, garantindo a sobrevivência da célula no fagossomo (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014).

O mecanismo molecular de ativação do PhoPQ se faz pela resposta a estímulos externo a celular através do domínio periplasmático do PhoQ (MILLER et al., 2011). O PhoQ é uma proteína tirosina quinase que ativa o PhoP por fosforilação, uma vez ativado, esse regulador ativa a transcrição do operon *pmrHFIJKLM* envolvido na síntese de LPS. Relatos científico implicam o PhoP na ativação do PmrA, direta ou indiretamente via PmrD, levando a adição de grupos PEtN ao LPS (GIAMARELLOU, 2016).

O PhoPQ é responsável por ativar a expressão de proteína transportadora de Mg^{+2} , enzimas envolvidas na diminuição do estresse celular e alguns fatores de virulência. As ativações de genes e operon modificadores do LPS são mediadas pela presença de peptídeos antimicrobianos catiônicos (*cationic antimicrobial peptides* - CAMP), devido a isso, alguns estudos apontam que a resistência às polimixinas causada por PhoPQ é uma resistência cruzada, uma vez que o mecanismo de ação dos CAMP se assemelha ao das polimixinas (GALES; JONES; SADE, 2011).

Diversas mutações são descritas para os genes *phoP* e *phoQ*, principalmente, no sensor tirosina quinase. Essas mutações são implicadas na resistência às polimixinas em *K. pneumoniae* e *E. coli* (COETZEE et al., 2016). Essas alterações na estrutura gênica leva a ativação constitutiva de PhoP e, conseqüentemente, regulação positiva da expressão de genes envolvidos na resistência às polimixinas (BECEIRO et al., 2014).

Recentemente o TCS CrrAB foi descrito em isolados clínicos de *K. pneumoniae* pelo grupo de Wright et al. (2015). Este TCS está contido no operon *crrAB*, que codifica o sensor tirosina quinase, CrrB, o regulador de resposta, CrrA, flaquado pelos genes de uma glicosiltransferase (H239_3059) e um proteína de membrana interna, CrrC (H239_3062) (CHENG et al., 2016). O papel fisiológico do CrrAB até o presente ainda é desconhecido (POIREL et al., 2017). Estudos conduzidos por Wright et al (2015) e Cheng et al (2016) relatam que a inativação do CrrB leva a superexpressão do operon *pmrAB*, conseqüentemente, causando a expressão do operon *pmrHFIJKLM* e dos genes *pmrE* e *pmrC* que leva a modificação do LPS e mudança no perfil de susceptibilidade às polimixinas. As mutações em CrrB levam a alto grau de resistência às polimixinas (CHENG et al., 2016; JAYOL et al., 2017). As CIM encontradas em linhagem de *K. pneumoniae* mutante para o CrrB variam de 500 $\mu\text{g/mL}$ a 1.024 $\mu\text{g/mL}$ (CHENG et al., 2016).

Foi relatado também m que o mecanismo de ativação que os altos níveis de expressão de PmrH estava associado a expressão de CrrC, uma vez que em mutantes onde o CrrC foi deletado apresentavas níveis diminuídos de RNAm de PmrH. Diante desses dados, Cheng et al. (2016) sugerem que CrrB regula a expressão do operon *pmrHFIJKLM* através de CrrC.

O operon *pmrHFIJKLM*, também denominado de *arnBCADTEF* ou *pbgP*, é responsável pela expressão de 7 proteínas envolvidas na síntese do grupo catiônico Lara4N (BARON et al., 2016). O operon *pmrHFIJKLM* e o gene *pmrE* são responsáveis pela modificação do LPS pela adição do Lara4N (JAYOL et al., 2015). O gene *pmrE* é codificador da segunda enzima envolvida diretamente na modificação do LPS (OLIATAN; MORAND; ROLAIN, 2014). Este operon está presente em *Salmonella* spp., *K. pneumoniae*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e ausente em *Acinetobacterbaumannii* (BARON et al., 2016)

Outro mecanismo de resistência bastante observado entre os isolados clínicos resistentes às polimixinas é o gene *mgrB*. A MgrB é uma pequena proteína de membrana interna de 47 aminoácidos responsável pela regulação negativa do TCS PhoPQ (CANNATELLI et al., 2014). O mecanismo molecular, segundo LIPPA e GOULIAN (2009) se faz pela inibição de PhoQ e/ou estimulando a sua atividade fosfatase, que por consequência desfosforila PhoP, levando a repressão de genes ativados por este regulador.

Em estudo recente Cannatelli et al. (2013) descreveu pela primeira vez um mecanismo molecular responsável pela emergência de *K. pneumoniae* resistente a colistina, o MgrB. A partir de então, diversas mutações, tanto missense quanto deletéria, tem sido implicada na inativação da MgrB em *K. pneumoniae* (CANNATELLI et al., 2013; POIREL et al., 2015). Essas mutações ocasionam tanto substituição de aminoácido quanto a expressão de uma proteína truncada. Outras alterações, como inserção ou deleção de pequena sequência dentro da sequência gênica do *mgrB* e, em alguns casos, deleção completa do *mgrB*, têm sido reportadas (CANNATELLI et al., 2013; GAIBANI et al., 2014; POIREL et al., 2014). Recentemente, Poirel et al (2015) relataram a inserção de gene que codifica para cefalosporina de amplo espectro na sequência gênica do *mgrB* em *K. pneumoniae*.

Outro determinante genético que tem sido implicado na resistência às polimixinas em *E. coli*, o MgrR. Este determinante é um *small RNA* (sRNA) responsável por exercer *feedback* negativo sobre a expressão da enzima EptB, responsável por adicionar PEtN nos resíduos externos da região do Kdo do LPS. Logo mutações no *mgrR* neste patógeno aumenta

a resistência as polimixinas, como resultado o aumento da modificação por adição de PEtN no Kdo (MOON; GOTTESMAN, 2009). Em outros gêneros da Enterobacteriaceae, como *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* o *mgrR* é conservado (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2016).

Outras modificações acontecem na cadeia de ácido graxo do lipídio A através de processo de desacetilação da cadeia ácido graxo do carbono 3 através do gene *pagL* ou pela adição de palmitato ao carbono 2 do lipídio A através do *pagP*. As proteínas ligadas aos genes *lpx*, como o LpxO que adiciona uma hidroxila (OH) ou um hidrogênio (H) na cadeia acil do carbono 3'. O LpxR remove uma cadeia acil no carbono 3' e o LpxT adiciona um radical fosfato ao grupo fosfato do carbono 1 do lipídio A. Todas essas modificações interfere no reconhecimento do lipídio A pelas polimixinas e conseqüentemente levam a resistência a este fármaco entre as enterobactérias (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014). Outras estratégias incluem a utilização de bomba de efluxo, formação de cápsula como já descrito em *K. pneumoniae* (PADILHA et al., 2010) e superexpressão de OprH (OLAITAN et al., 2014).

A resistência às polimixinas tinha sido relatada apenas em mecanismos cromossômicos que não possibilita a transferência horizontal, até pouco tempo. Mais recente, foi descrito um mecanismo mediado por plásmídeos, o *mcr-1* (HASMAN et al., 2015). Este gene foi descrito pela primeira em isolados de *E. coli* de alimentos oriundos de porcos e aves e em humanos na China (LI et al., 2015). O fato de esse gene ser mediado por plasmídeo tem implicações clínicas, pois além da rápida disseminação, estes plasmídeos geralmente conferem resistência a outros antimicrobianos, podendo levar a um surto de bactéria denominada como pan-resistentes (*pandrug resistant* - PDR) e a falência da terapia antimicrobiana em escala. (BORAN et al., 2016; LIU et al., 2016; SAMPAIO; GALES, 2016).

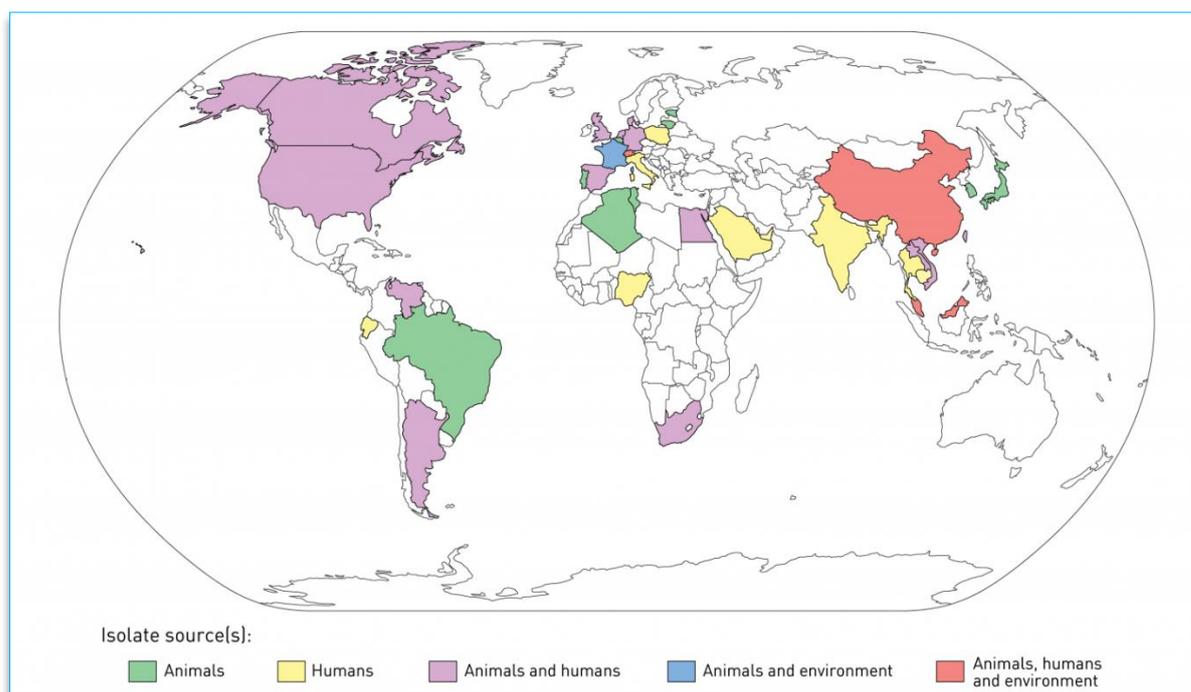
2.2.4 Epidemiologia da resistência às polimixinas

Nos últimos anos, o uso e a pesquisa sobre polimixinas vieram se intensificando (KEMPF et al, 2013). Apesar da sua toxicidade, estes peptídeos antimicrobianos vêm substituindo os antibióticos comumente usados na clínica contra infecções causadas por BGN-MDR (OLAITAN et al., 2014). As polimixinas são consideradas a última linha de

tratamento para espécies de Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases (CRE) (AGUAYO et al., 2016). Devido à importância adquirida por este fármaco desde 2012, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reclassificou a colistina como criticamente importante para a medicina humana (WHO, 2012). Porém à carência de novas entidades químicas antibacterianas e a rápida disseminação de genes de resistência, principalmente, os mediados por plasmídeos, colocam em cheque a terapêutica clínica (SUN et al., 2018).

O surgimento da resistência às polimixinas é relatado em diversos países nos cinco continentes (CANNATELLI et al., 2014; GIANI et al., 2015). Esse quadro se torna mais crítico, quando a resistência às polimixinas é encontrada em CRE, representando uma ameaça à saúde pública global (figura 5) (PARISI et al., 2015). A resistência às polimixinas em microrganismos produtores de carbapenemases aumenta a mortalidade e reduz as opções terapêuticas (BONURA et al., 2015).

FIGURA 5 – Mapa representando a disseminação do gene *mcr-1*



Fonte: Figura modificada TWAFIG; LAXMINARAYAN; MENDELSON, 2016.

Um estudo multicêntrico conduzido na Itália, apontou um aumento de mais de 3 vezes em um período de 4,5 anos de isolados de CRE resistentes à colistina (CRE-ColR) (GIACOBBE et al., 2015). Monaco et al. (2014), publicou que 43% dos isolados obtidos de 21 laboratórios hospitalares, entre 2013 e 2014, representavam cepas CRE-ColR. Neste estudo foi visto também que 6% dos isoladas eram resistentes à tigeciclina, 16% à

gentamicina, 82% eram resistentes à trimetoprim-sulfametaxazol e 1% eram resistentes a todos os quatro antibióticos testados e os isolados CRE-ColR foram encontrados em todos os laboratórios. O aumento progressivo da resistência à colistina também é relatado na Espanha (PENA et al., 2014).

Estudos apontam o *mgrB* como principal mecanismo de resistência às polimixinas em isolados de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (CANNATELLI et al., 2013; CANNATELLI et al., 2014; BONURA et al., 2015; GIANI et al., 2015). Outro estudo com banco de cepas de *K. pneumoniae* resistentes à colistina de origem mundial identificou a troca de um único aminoácido na proteína PmrB como sendo responsável pelo fenótipo de resistência às polimixinas (JAYOL et al., 2014).

Em novembro de 2015, Li et al. (2016) descreveu *E. coli* resistente à colistina de origem comunitária e humana, sendo o primeiro caso de resistência por gene mediado por gene plasmidial, o *mcr-1*. Na segunda metade de 2016, o *mcr-1* foi detectado em 35 países no mundo, sendo que em 29 países os casos foram relatados como de origem animal e em 22 países sendo detectados em humanos, conforme figura abaixo (LIU et al., 2016; OLAITAN, MORAND, ROLAIN, 2016).

Dentro de poucos meses após a primeira notificação, o *mcr-1* foi identificado em vários países abrangendo Europa, África, América do Sul, América do Norte e Ásia sendo os isolados bacterianos de origem animal, humana e ambiental (COETZEE et al., 2016; DOUMITH et al., 2016; KOU et al., 2016; NGUYEN et al., 2016). Outros estudos já relataram a presença desse gene em diversos gêneros bacterianos como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* e *Enterobacter* (COETZEE et al., 2016; DOUMITH et al., 2016; KOU et al., 2016; NGUYEN et al., 2016; SAMPAIO; GALES, 2016)

Embora tenha sido descrito pela primeira vez em 2015, um relatório do mesmo grupo anunciou a presença de *mcr-1* em coleção de *E. coli* resistentes à colistina que data a década de 1980, enquanto que na Europa os registros mais antigos são de 2005, na França, e 2009, na Holanda (PRIM et al., 2016; SKOV; MONNET, 2016) Análises moleculares da sequência de aminoácido do *mcr-1* mostrou uma similaridade com a EptA de *Paenibacillus sophorae* e *Enhydrobacter aerosaccus*. Foi no gênero *Paenibacillus* que as polimixinas foram isoladas e é sabido que bactérias que produzem antibióticos são capazes de resistir a eles (BARON et al., 2016). Estudos estruturais mostraram que o *mcr-1* está intimamente relacionado a LptA de

Neisseria meningitidis e EptC de *Campylobacter jejuni* que são intrinsecamente resistentes as polimixinas (BARON et al., 2016; LIU et al., 2016). Isto sustenta a hipótese de que o *mcr-1* tem função de PEtN transferase, levando a adição de PEtN ao lipídio A (HASMAN et al., 2015).

Em estudo recente foi observado que existe uma diversidade significativa entre plasmídeos que transportam o *mcr-1* (YE et al., 2016). Entre os grupos de incompatibilidade de plasmídeos que são relacionados ao *mcr-1* incluem IncI2, IncHI2, IncHI2A, IncX4 e IncP, que são altamente competentes na transferência conjugativa e que carregam outros genes de resistência, tais como *bla_{NDM-5}*, *bla_{CTX-M}* e *bla_{KPC}* (BARON et al., 2016).

A resistência às polimixinas no Brasil, em curto espaço de tempo, teve aumento nas suas taxas, principalmente, entre espécies de Enterobacteriaceae (GALES; JONES; SADER, 2011). O primeiro caso de BGN resistente às polimixinas no Brasil, data do ano 2006 (GALES; JONES; SADER, 2006). Desde então, os relatos sobre a taxa de resistência no país vêm aumentando consideravelmente. Segundo Gales e Sampaio (2016) na América Latina, foi evidenciada uma taxa de resistência de 3% entre isolados de *K. pneumoniae*. Já Pereira et al. (2016) relataram uma taxa de 15% de resistência às polimixinas em isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 de diversos estados do Brasil. Mais recentemente, Bartolleti et al. (2016) descreveram uma taxa de resistência de 27,1% entre isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC na cidade de São Paulo, maior metrópole brasileira.

Estudo recente em uma coleção de bacilos Gram-negativos do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas de São Paulo, coletados entre os anos de 2010 a 2014, Rossi et al. (2016) observaram um aumento da resistência à colistina entre espécies de enterobactérias quando comparado com bacilos não fermentadores. A espécie mais frequente foi *K. pneumoniae* com 84,1% dos isolados ColR, seguida de *Enterobacter cloacae* (7,4%), *E. aerogenes* (3,6%), *Escherichia coli* (3,1%), *C. freundii* (0,5%), *Salmonella* spp. (0,4%), *Pantoea* spp. (0,3%), *K. ornithinolytica* (0,2%) e *E. asburiae* (0,1%) (ROSSI et al., 2016).

Neste estudo, foi visto que 21,5% dos isolados resistentes à colistina apresentavam-se sensíveis aos carbapenêmicos. Segundo Rossi et al. (2016) este fenótipo não é comumente descrito devido ao fato de muitos laboratórios clínicos avaliarem apenas a suscetibilidade às polimixinas em isolados resistentes aos carbapenêmicos. Contudo, este fenótipo merece atenção, uma vez que, tem maior propensão desses candidatos virem a se tornar resistentes

aos carbapenêmicos o que levará uma falta de opção terapêutica para tratamento das infecções causadas por esses patógenos (ROSSI et al., 2016).

Apesar das polimixinas serem utilizadas na clínica médica há décadas, a farmacocinética e a farmacodinâmica das drogas ainda permanece pouco compreendida. Este fato pode possibilitar à exposição das bactérias as doses subletais durante o tratamento, o que pode levar a seleção de cepas clínicas resistentes (FERNÁNDEZ et al., 2010; CANNATELLI et al., 2014). A compreensão dos mecanismos de regulação positiva cromossomal e dos ditos adquiridos é fundamental para o desenvolvimento do conhecimento da resistência às polimixinas. Apesar de a resistência às polimixinas ser implicada na exposição prévia a este fármaco, estudos recentes têm demonstrado a presença de bactérias resistentes às polimixinas sem qualquer contato prévio, o que aumenta o enigma sobre os mecanismos envolvidos nesta resistência (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2016).

A compreensão dos mecanismos de regulação positiva cromossomal e dos ditos adquiridos é fundamental para o desenvolvimento do conhecimento da resistência às polimixinas. Apesar de a resistência às polimixinas ser implicada na exposição prévia a este fármaco, estudos recentes têm demonstrado a presença de bactérias resistentes as polimixinas sem qualquer contato prévio, o que aumenta o enigma sobre os mecanismos envolvidos nesta resistência (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Analisar a estrutura gênica dos determinantes genéticos envolvidos na resistência às polimixinas no genoma do isolado clínico de *Citrobacter freundii* oriundo de um hospital terciário de referência do Recife-PE, que apresenta alto nível de resistência à colistina e identificar o mecanismo de ação envolvido nesse perfil de susceptibilidade.

3.2 ESPECÍFICOS

- Analisar a estrutura molecular dos determinantes genéticos envolvidos na resistência às polimixinas no genoma do *Citrobacter freundii* C156;
- Identificar possíveis eventos genéticos (mutação, inserção ou deleção) nos determinantes genéticos envolvidos na resistência às polimixinas no genoma de *Citrobacter freundii* C156;
- Verificar a associação desses eventos na resistência a polimixinas no isolado clínico *Citrobacter freundii* C156.
- Identificar a linhagem da cepa *C. freundii* C156
- Análisar o resistoma e do perfil plasmidial *in silico* da cepa *Citrobacter freundii* C156.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE

O isolado clínico *Citrobacterfreundii* C156 foi obtido em julho de 2016 de amostra de líquido pleural de paciente do sexo masculino de 76 anos de idade atendido na clínica médica de um hospital de referência do Recife-PE. A identificação da espécie e o perfil de suscetibilidade inicial foram realizados pelo VITEK2 (bioMérieux).

A identificação e a espécie do espécime em estudo foram confirmadas através do sistema MALDI Biotyper (Bruker Daltonics). E para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada a técnica de microdiluição em caldo difusão (CLSI, 2010), interpretada segundo os parâmetros do EUCAST (<http://www.eucast.org/>). Resumidamente, um inóculo de *Citrobacter freundii* (1×10^4 UFC) foram aplicadas em placas de 96 poços contendo caldo Mueller-Hinton (Difco) com concentração de cátions ajustada e concentrações seriadas de sulfato de polimixina B (Sigma). As CIMs foram determinadas após incubação a 37 ° C por 18-24h.

O CIM para *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi determinado em paralelo para fornecer um controle de qualidade do teste. Para controle positivo foi determinado o CIM para *E. coli* C153 resistente a polimixina e *mcr-1* positiva (ROCHA, et al. 2017).

4.2 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DO *CITROBACTER FREUNDII* C156

O genoma bacteriano da cepa *C. freundii* C156 foi sequenciado utilizando o *Nextera XT Library Preparation Protocol* de acordo com as instruções do fabricante (Illumina Inc, EUA). Para tagmatação, 5 µL DNA [0.42 ng/µL] da amostra foi adicionado em um microtubo contendo 11 µL do *Tagment DNA buffer* e 5 µL do *Amplicon Tagment Mix Buffer*, sendo centrifugado a 280 x g durante 1 minuto e incubadas a 55 °C durante 3 minutos em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Em seguida, 5 µL do *Neutralize Tagment Buffer* foi adicionado, sendo novamente centrifugado a 280 x g durante 1 minuto e deixar a amostra a temperatura ambiente por 5 minutos.

Para amplificação do DNA genômico tagmentado foi adicionado 15 µL do *Nextera PCR Master Mix* e foram adicionados 4 µL dos *Index 1* (N7XX) e 2 (S5XX) necessários para

a formação dos *clusters* na etapa de sequenciamento. As condições de amplificação corresponderam a uma etapa inicial a 72 °C durante 3 minutos e 95 °C durante 30 segundos, seguidos por 12 ciclos a 95 °C durante 10 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C durante 30 segundos, finalizado por uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

Em seguida foi realizada a purificação da biblioteca gerada, promovendo a remoção de fragmentos curtos. Nesta etapa 50 µL do produto amplificado foi transferido para um novo microtubo e homogeneizado em vórtex por 30 segundos. Um volume de 25 µL de *AMPure XP Beads* foi adicionado e homogeneizado sob agitação vigorosa por 1 minuto. Passado este tempo, a amostra foi posicionada sobre uma placa magnética (*Magnetic Stand-96, Thermo Fisher Scientific Inc.*) e foi lavada duas vezes com 200 µL de etanol 80%, sendo 20 µL do sobrenadante resultante do processo de lavagem transferido para uma nova placa.

Inicialmente, a biblioteca de DNA previamente normalizada foi diluída 1:1000 (v/v) em 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 0,05% Tween 20. Um total de 4 µL da diluição foi adicionado em 12 µL do *KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix containing Primer Premix* e o volume completado com água ultrapura para 20 µL de reação. Como calibradores das reações foram utilizados 4 µL de cada *dsDNA Standard* (KAPA Biosystems). A reação consistiu em uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C durante 5 minutos seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos e 60 °C por 45 segundos correspondentes ao anelamento dos oligonucleotídeos, extensão e aquisição de dados a cada ciclo. Depois do ciclo de térmico, sob temperatura ambiente, a amostra foi diluída a 250 pmol em água ultrapura homogeneizada com o auxílio de uma pipeta automática e transferida para um microtubo contendo o *Hybridization Buffer HT1*, sendo posteriormente desnaturada a 96 °C durante 2 minutos em termociclador e inserida no *MiSeq Reagent Kits v2* (Illumina Inc.). A reação de sequenciamento foi realizada em plataforma *MiSeq Sequencing System* (Illumina Inc.), no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do IAM, de acordo com os parâmetros indicados no *MiSeq System User Guide* (Illumina Inc.)

4.3 MONTAGEM DA ASSEMBLÉIA GENÔMICA

Após o sequenciamento, o genoma foi montado utilizando a ferramenta SPAdes 3.0, disponível online (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SPAdes/>). A SPAdes 3.0 apresentou melhor

desempenho na montagem, pois é capaz de identificar leituras quiméricas, além de dispor de duas ferramentas de montagem mostrando o desempenho de ambas as ferramentas (NURK et al., 2013).

Para anotação foram utilizadas as ferramentas RAST (<https://rast.nmpdr.org>). Essa ferramenta é voltada para a anotação de genomas de eubactérias e arqueobactérias. Identifica os genes de codificação de proteínas, rRNA e tRNA, prediz as funções dos genes, prevê subsistemas e usa essas informações para reconstruir a rede metabólica (AZIZ et al., 2008).

4.4 ANÁLISE DOS DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS

A análise da integridade das sequências dos determinantes de resistência às polimixinas foi realizada através de busca por similaridade utilizando a ferramenta BLAST e suas variantes contra o banco de dados de sequências proteicas e nucleotídicas do Centro Nacional de Informação sobre Biologia (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI). Para ponto de corte foram utilizados *e-value* de e^{-5} .

Para pesquisa dos possíveis determinantes genéticos associados à resistência do isolado *C. freundii* C156 às polimixinas, foram analisados em seu genoma vários *loci* previamente relacionados a esse fenótipo de resistência na família Enterobacteriaceae em comparação por alinhamento múltiplo de sequências, utilizando variantes de BLAST, com genomas e sequências disponíveis no Centro Nacional de Informações Biotecnológica (NCBI - *National Center Biotechnology Information*). Para predição de alterações na função proteica foi utilizada ferramenta Provean (<http://provean.jcvi.org/index.php>).

Com o auxílio da ferramenta SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) foi identificação das sequências dos domínios dos determinantes de resistência às polimixinas pesquisados neste estudo. A ferramenta PSORT (<http://psort1.hgc.jp/form.html>) foi utilizada para predição da sublocalização celular das proteínas CrrC, CrrB e CrrA. E por fim, foi utilizada a ferramenta TrSSP (<http://bioinfo.noble.org/TrSSP/>) para predição da função de transporte e substrato específico para o CrrC.

4.5 ANÁLISE DO RESISTOMA, PERFIL PLASMIDIAL E TIAPEGM POR *MULTILOCUS SEQUENCE TYPING* (MLST)

Para pesquisa dos determinantes genéticos de resistência cromossômicos e adquiridos dos demais antibióticos foi utilizada a ferramenta ResFinder 3.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) com *cut off* para cobertura mínima de 40% e *threshold* para identidade de 60%. Estes parâmetros foram selecionados para ampliação da busca por sequências candidatas no genoma da cepa *C. freundii* C156. Os candidatos elencados foram confrontados contra o banco de dados de proteínas do NCBI através da ferramenta BLASTp. Para seleção foi utilizado o seguinte parâmetro de escolha *e-value* de e^{-5} , este parâmetro informa a chance de alinhamento ter ocorrido ao acaso.

Para identificação do perfil plasmidial foi utilizada a ferramenta PlasmidFinder 1.3 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>), que classifica os grupos de incompatibilidade de plasmídeos de acordo com as sequências de origens de replicação e componentes plasmidiais da base genômica para plasmídeos de Enterobacteriaceae utilizando a ferramenta BLASTn. Um *cut off* para cobertura mínima de 40% e *threshold* para identidade de 60% foram aplicados na busca das sequências de nucleotídeos. Estes parâmetros baixos foram utilizados para uma busca ampliada do genoma da cepa *C. freundii* C156. Os candidatos elencados foram confrontados contra o banco de dados de nucleotídeo do NCBI através da ferramenta BLASTn. Para confirmação da sequência foi utilizada *e-value* de e^{-5} .

As sequências dos *contigs* foram analisadas pela ferramenta BLASTn contra o banco de dados do MLST 2.0 *Citrobacter freundii* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>) para a tipagem por *Multilocus sequence typing*.

5 RESULTADOS: ARTIGO – SUBSTITUIÇÃO DE UM ÚNICO AMINOÁCIDO NO SENSOR DE HISTIDINA QUINASE CRRB IMPLICOU NA RESISTÊNCIA À COLISTINA NO ISOLADO CLÍNICO DE *Citrobacter freundii*.

INTRODUÇÃO

O aumento das infecções causadas por bactérias Gram-negativas (BGN) multidrogas resistentes (*multidrug-resistant* – MDR) e a falta de uma nova droga potencialmente ativa contra esses patógenos, tem levado a comunidade médica ao uso de antigas drogas, como as polimixinas (GIAMARELLOU, 2016). Contudo, o aumento e o inapropriado uso deste fármaco têm levado, de maneira rigorosa, ao surgimento de bactérias resistentes às polimixinas, em especial à família Enterobacteriaceae (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014).

A emergência e disseminação de Enterobacteriaceae resistentes a carbapenêmicos (Carbapenem resistant Enterobacteriaceae - CRE) é a maior preocupação tanto na clínica quanto na saúde pública (GALES et al., 2012). A emergência de diferentes variantes de enzimas capazes de hidrolisar este grupo de antimicrobianos, conhecidas como carbapenemases, levou ao ressurgimento de velhas drogas como última opção de tratamento viável.

Estudos dos mecanismos de resistência às polimixinas mostram que mutações cromossômicas são frequentemente implicadas na aquisição de resistência em *Pseudomonas aeruginosa* (MILLER et al., 2011), *Acinetobacter baumannii* (MOFFATT et al., 2011) e, mais recentemente, em *Klebsiella pneumoniae* (GAIBANI et al., 2014; POIREL et al., 2015). A maioria destes mecanismos é direcionada a modificação do lipídio A, porção basal do lipopolissacarídeo (LPS), que é o primeiro alvo das polimixinas (GALES et al., 2012). Os mecanismos associados à resistência às polimixinas podem ser diversos nos diferentes gêneros bacterianos, mas na maioria das vezes seguem uma via comum de modificação do lipídio A, com adição de 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (Lara4N) e/ou de fosfoetanolamina (PEtN) (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2016).

A adição de Lara4N é coordenada pelo operon *arnBCADTEF*. Este operon é finamente regulado por sistemas de dois componentes (TCS), principalmente PhoPQ e PmrAB (OLAITAN et al, 2016). E mutações nos TCS PhoPQ e PmrAB têm sido descritas em

Salmonella spp., *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014). Estas mutações levam a ativação constitutiva dos TCS e subsequentemente aumento na expressão dos genes regulados por estes sistemas regulatórios, que ocasiona a adição Lara4N ao lipídio A (BARON et al., 2016).

As mutações descritas no TCS PmrAB ocorrem geralmente na proteína quinase PmrB, que faz com que o regulador PmrA não seja desfosforilado. O regulador PmrA também é ativado indiretamente pelo TCS PhoPQ através da proteína PmrD, que parece atuar evitando desfosforilação de PmrA (OLIATAN et al., 2014). O sistema regulatório PmrAB atua na ativação do operon *arnCABDTEF* conferindo assim resistência às polimixinas através da via adição de Lara4N, mas também atua na ativação do operon *pmrCAB* que aumenta a expressão de *pmrC*, que é uma fosfoetanolamina (PEtN) transferase, responsável pela adição de PEtN ao lipídio A (BARON et al., 2016).

Outro mecanismo descrito em isolados clínicos de *K. pneumoniae* consiste em mutações ou inserção de sequência (*Insertion Sequence* – IS) no determinante genético MgrB que inativa essa proteína e aumenta da resistência entre estes isolados (CANNATELLI et al., 2013; CANNATELLI et al., 2014). Esta proteína atua por *feedback* negativo sobre o PhoQ, fazendo que não haja fosforilação de seu correlato regulador PhoP e consequentemente a não ativação dos seus genes regulados (PORIEL et al., 2015). Olaitan et al. (2014) relatou que a inativação do MgrB, por inserção de IS, levava ao aumento de isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes às polimixinas no LAO, Tailândia, Nigéria, Israel e França.

A resistência às polimixinas tinha sido relatada apenas com mecanismos cromossomais que não possibilita a transferência horizontal, até pouco tempo. Mas recente, foi descrito um mecanismo mediado por plasmídeos, o Mcr-1 (*Mecanism Colistin Resistance*) (HASMAN et al., 2015). Este gene foi descrito pela primeira em isolados de *E. coli* de porcos na China (LIU et al., 2016). O fato de esse gene ser mediado por plasmídeo tem implicações clínicas, pois além da rápida disseminação, estes plasmídeos geralmente conferem resistência a outros antimicrobianos, podendo levar a um surto de bactéria denominada como pan-resistentes e a falência da terapia antimicrobiana em escala mundial (BORAN et al., 2016; LIU et al., 2016).

A heterorressistência pode ser definida como um subconjunto de populações isogênicas de bactérias que apresentam perfil de suscetibilidade diferente aos antibióticos (CAIN et al.,

2018). A heterorressistência tem sido considerada um marcador na aquisição rápida de resistência, isto resulta na falha terapêutica (EL-HALFAWY; VALVANO, 2015). Contudo, o real impacto desse fenótipo sobre a resistência bacteriana ainda é pouco conhecido, devido a dificuldade de detectar subpopulações bacterianas usando métodos padrões laboratoriais (JAYOL et al., 2015).

Para as poliximixinas, a heterorressistência foi estudada fenotipicamente em *K. pneumoniae* e a base genética da heterorressistência pode estar relacionada a mutações (SNPs ou duplicações de genes tandem) em TCSs conferem colR em cepas Gram-negativas (POUDYAL et al., 2008).

A compreensão cada vez maior dos mecanismos envolvidos na resistência às polimixinas é extremamente vital e oportuno para facilitar o desenvolvimento de novos antimicrobianos que sejam potentes no combate das BGN-MDR clinicamente relevantes (ROSSI et al., 2016). Por isso diante do exposto, se faz necessário o estudo molecular do mecanismo de resistência apresentado pelo isolado de *Citrobacter freundii* altamente resistente a colistina para adoção de medidas profiláticas de interesse clínico e para evitar a propagação de bactérias resistentes a colistina e a falha terapêutica.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Isolamento e perfil de susceptibilidade

O isolado clínico *Citrobacterfreundii* C156 foi obtido de amostra de líquido pleural de paciente do sexo masculino de 57 anos atendido na clínica médica de um hospital de referência do Recife-PE. A identificação da espécie e o perfil de suscetibilidade inicial foram realizados pelo VITEK2 (bioMérieux).

O teste de sensibilidade à polimixina B foi realizado pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com as recomendações do CLSI, (2010) e interpretado segundo os critérios do EUCAST (<http://www.eucast.org/>). As cepas *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram utilizadas como controle de qualidade do teste. Para controle positivo foi determinado o CIM para *E. coli* C153 resistente a polimixina e *mcr-1* positiva (ROCHA, et al., 2017). Para a leitura, após a incubação de *overnight*, foi adicionado 10 ul de resazurina,

corante indicador de oxirredução e utilizado para medir a viabilidade celular, e incubada a placa por 3 horas em estufa a 37 °C.

A identificação e a espécie do espécime em estudo foram confirmadas através do sistema MALDI Biotyper (Copyright Bruker 2018). Através da análise de padrões característicos de proteínas abundantes para identificação da espécie.

2. Sequenciamento do genoma do *Citrobacter freundii*

O genoma bacteriano da cepa *C. freundii* C156 foi sequenciado utilizando o *Nextera XT Library Preparation Protocol* de acordo com as instruções do fabricante (Illumina Inc, EUA). A reação de sequenciamento ocorreu no *MiSeq Sequencing System* (Illumina Inc.), no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do IAM, de acordo com os parâmetros indicados no *MiSeq System User Guide*.

3. Análise *in silico* dos determinantes de resistência à colistina, resistoma, perfil plasmidial e MLST

A montagem e anotação do genoma foi feita com as ferramentas SPAdes 3.9 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SPAdes/>), pela técnica De Novo, e o RAST (<http://rast.nmpdr.org>), respectivamente. As sequências dos *contigs* foram analisadas pela ferramenta BLASTn contra o banco de dados do MLST 2.0 *Citrobacter freundii*, ResFinder 3.0 e PlasmidFinder 1.3 do *Center of Genomic Epidemiology* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services>) para a tipagem por MLST, identificação de determinantes de resistência antimicrobiana adquirida e presença de plasmídeos, respectivamente.

Para pesquisa dos possíveis determinantes genéticos associados à resistência do isolado *C. freundii* C156 às polimixinas, foram analisados em seu genoma vários *loci* previamente relacionados a esse fenótipo de resistência na família Enterobacteriaceae. Essas análises foram obtidas através da comparação por alinhamento múltiplo de sequências, utilizando variantes de BLAST, com genomas e sequências disponíveis no Centro Nacional de Informações Biotecnológica (NCBI - *National Center Biotechnology Information*). Para predição de alterações na função protéica foi utilizada ferramenta Provean (<http://provean.jcvi.org/index.php>).

Com o auxílio da ferramenta SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) foi identificação das sequências dos domínios dos determinantes de resistência a colistina pesquisados neste trabalho. A ferramenta PSORT (<https://psort.hgc.jp>) foi utilizada para a predição da localização na célula das proteínas CrrC, CrrB e CrrA. E por fim, foi utilizada a ferramenta TrSSP (<http://bioinfo.noble.org/TrSSP/>) para predição da função de transporte para o CrrC.

RESULTADOS

TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AO ANTIMICROBIANO

O isolado de *C. freundii* C156, apresentando resistência à colistina com concentração inibitória mínima (CIM) ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ e susceptibilidade aos carbapenêmicos CIM $\leq 0,25$ $\mu\text{g/mL}$, determinado pelo Vitek2 (bioMérieux), foi obtido em cultura de líquido pleural de um paciente do sexo masculino, 76 anos de idade, internado em hospital universitário de referência da Região Metropolitana do Recife com diagnóstico inicial de infecção do trato respiratório. A identificação da espécie *C. freundii* foi confirmada pelo MALDI Biotyper e pela análise de seu genoma. Na mesma amostra foi isolada uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, de CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$, sensível a Colistina, CIM de $\leq 0,25$ $\mu\text{g/mL}$ (tabela 1).

Tabela 1: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos determinado pelo Vitek2.

ANTIMICROBIANO	<i>Citrobacter freundii</i>
	CIM
Cefepima	8
Cefoxitina	1
Ceftazidima	16
Ceftriaxona	≥ 64
Cefuroxima	≥ 64
Ciprofloxacina	1
Colistina	≥ 16
Ertapenem	$\leq 0,5$
Imipenem	$\leq 0,25$
Meropenem	$\leq 0,25$
Gentamicina	≥ 16
Piperacilina/Tazobactam	4
Tigeciclina	1

OBSERVAÇÃO: Todas as CIM estão em $\mu\text{g/ML}$. CIM: concentração inibitória mínima

A CIM de polimixinas B pelo método de microdiluição em caldo para o isolado *C. freundii* C156 foi igual a 128 $\mu\text{g/mL}$, confirmado o fenótipo de resistência às polimixinas de alto nível, se considerarmos que espécies de Enterobacteriaceae são classificadas como

resistentes apresentando uma CIM de polimixina B ou colistina igual a 2 µg/mL, de acordo com o EUCAST.

ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO GENÔMICO E COMPARAÇÃO COM GENOMAS REFERÊNCIA DE *Citrobacter freundii*

No tangente a análise da qualidade do sequenciamento foi obtida pelo programa FASTQ, o que mostrou uma qualidade boa para o genoma do *C. freundii* C156. Quanto a montagem do genoma usando SPAdes 3.9 (<http://bioinf.spbau.ru/spades>) foram obtidas 275 *contigs*, com o tamanho da maior *contig* foi de 224.597 bases e N50 de 59.333, conteúdo GC de 51,58% e o tamanho do genoma total de 5.134.774 bases, condizente com os genomas descritos na literatura para o *C. freundii* (tabela 2).

Tabela 2: Resultado da montagem do genoma da cepa c156

PARÂMETROS DE QUALIDADE	RESULTADOS PARA O GENOMA DE C156
NÚMEROS DE CONTIG	275
N50	59.333
TAMANHO DO MAIOR CONTIG	224.597
CONTIG > 1K	193
QUANTAS BASES EM CONTIGS > 1K	5.096.078
TAMANHO TOTAL DO GENOMA	5.134.774

K, kilobases

O genoma da cepa *C. freundii* C156 foi comparado com os genomas das cepas selvagens de *C. freundii* CFNIH1 (NZ_CP007557.1) e CAV1321 (NZ_CP011612.1) por estarem completamente montados e serem frequentemente utilizadas como referências em outros estudos por diferentes grupos de pesquisa, além de serem sensíveis às polimixinas. As características dos seus genomas estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3: Comparação do genoma da C156 e os genomas de *Citrobacter freundii* disponíveis no NCBI

CARACTERÍSTICAS GENÔMICAS	C156	CFNIH1	CAV1321
Tamanho total do genoma	5.134.774	5.371.330	5.489.4000
Conteúdo GC	51,58%	52,2%	51,56%
Números de CDS	4.841	5.092	5.250

Legenda: GC, Guanina e Citosina; CDS, Região codificante (Coding Sequence).

ANÁLISE DO RESISTOMA E PERFIL PLASMIDIAL

A busca por determinantes genéticos de resistência adquirida aos antimicrobianos e presença de plasmídeos pelo ResFinder 2.1 mostrados na tabela 4. A análise plasmidial pela PlasmidFinder 1.3 resultou nos plasmídios de grupo de incompatibilidade IncH2 (BX664015), RepA (CP011611), ColRNAI (DQ298019) e IncHI2A (BX664015), conforme apresentado na tabela 5.

Tabela 4: Genes de resistência encontrados no genoma do *Citrobacter freundii* C156

CLASSE DE ANTIMICROBIANOS	GENES DE RESISTENCIA	IDENTIDADE (%)	COBERTURA (%)
Aminoglicosídeos	<i>aa(3)-la</i> ,	99,7	100 (861/861)
	<i>aac(5')-lbc*</i>	100	100 (600/600)
	<i>aadA1</i>	99,75	100 (837/837)
	<i>strAB</i>	100	100 (804/804)
Flouroquinolonas	<i>qnrB1</i>	99.85	99.85 (682/681)
	<i>aac(5')-lbc*</i>	100	100 (600/600)
Betalactâmicos	<i>bla_{CTX-M-15}</i>	100	100 (876/876)
	<i>bla_{TEM-1B}</i>	100	100 (861/861)
	<i>bla_{OXA-1}</i>	100	100 (831/831)
	<i>bla_{CMY-41}</i>	99.30	100 (1146/1146)
Fenicol	<i>catA1</i> ;	99.85	99.85 (655/660)
	<i>catB3</i> ;	100	100 (549/549)
Sulfomanidas	<i>sul2</i>	100	100 (816/816)
Trimetropim	<i>dfA14</i>	99.59	100 (483/483)
Tretaciclínas	<i>tet(34)</i>	81.36	

Observação: as análises foram realizadas com auxílio da ferramenta ResFinder 2.1 disponível em (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>).

Tabela 5: Pesquisa de plasmídeos do *Citrobacter freundii* C156 e seus grupos de incompatibilidade

Plasmídeo Número de acesso	Identidade (%)	Cobertura (%)	Contig	OBS
<i>IncH2</i> (BX664015)	100,0	100 (327/327)	NODE_48_length_36327_cov_4.20989	-
<i>RepA</i> (CP011611)	80,3	100 (596/596)	NODE_48_length_36327_cov_4.20989	pKPC- CAV1321
<i>ColRNAI</i> (DQ298019)	100,0	100 (130/130)	NODE_113_length_9420_cov_28.8044	-
<i>IncHI2A</i> (BX664015)	100,0	100 (630/630)	NODE_120_length_7076_cov_3.43949	-

Observação: as análises foram realizadas com auxílio da ferramenta PlasmidFinde.1.3 disponível em (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>).

ANÁLISE DOS DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS

A análise comparativa dos genes ortólogos de *C. freundii* C156 e das Enterobacteriaceae associados à resistência de às polimixinas, listados na Tabela 06, revelou mutações que resultaram em substituições em alguns aminoácidos de suas proteínas, quando

comparado com as mesmas das cepas selvagens. As sequências das proteínas com substituições de aminoácidos foram submetidas a análises de função proteicas pela ferramenta Provean, que tem o poder de inferir se tais alterações seriam deletérias ou neutras para as suas funções. Dentre todas as proteínas aqui testadas, a substituição de aminoácido A91T na proteína CrrB do *C. freundii* C156 foi a única que, com significância estatística dada pelo teste, parece ser deletéria para a sua função (tabela 6).

Tabela 6: Análise de homologia dos determinantes genéticos envolvidos na resistência a polimixinas.

Determinantes de resistência	Produto/Função	Genes de Referência (NCBI)	Identidade	Positividade	Variante	Predição funcional
PhoP	Regulador	CP026238.1	100%	100%	-	-
PhoQ	Sensor	CP012554.1	100%	100%	-	-
PmrA	Regulador	WP_003031849.1	100%	100%	-	-
PmrB	Sensor	WP_032938137.1	100%	100%	-	-
PmrC/EptA	Fosfoetanolamina transferase	CP026235.1	99%	99%	S254G	Neutra
PmrD	Regula PmrA	CP027849.1	99%	99%	A60V	Neutra
MgrB	Regula de PhoP	WP_038641290.1	98%	100%	V12I	Neutra
EptB	Fosfoetanolamatra transferase	CP018810.1	100%	100%	-	-
CrrA	Regulador	WP_048234170.1	99%	99%	T21K	Neutra
CrrB	Sensor	WP_071684973	99%	99%	A91T	Deletéria

A cepa *C. freundii* C156 não apresentou alterações significativas nos outros determinantes relacionados à resistência de enterobactérias às polimixinas e foi negativa para genes plasmidiais de resistência às polimixinas, *mcr-1* e variantes. O gene *crrB* codifica para um sensor de histidina quinase do TCS CrrAB, presente em algumas linhagens de várias espécies de Enterobacteriaceae. Estudos prévios utilizando *K. pneumoniae* como modelo relacionam alterações em CrrB ao fenótipo de resistência à colistina em *Klebsiella*.

Com o auxílio da ferramenta SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) foi predito os domínios funcionais das proteínas CrrA, CrrB e CrrC. Para a proteína CrrB foram identificados dois domínios transmembranar, posições 12/34 e 54/76, HAMP (*Histidine kinases, Adenyl cyclases, Methyl-accepting proteins and Phosphatases*) localizada 81 a 135, Histidina quinase (HISKA), 136 a 200 e o fosfatase (HATPase_c), 244 a 353 (figura 1A). Já o regulador CrrA apresentou o domínio receptor de sinal (REC) localizado entre as posições 8 e 119 e o de ligação ao DNA (Trans reg_C) na posição 161 a 230 (figura 1B). Para

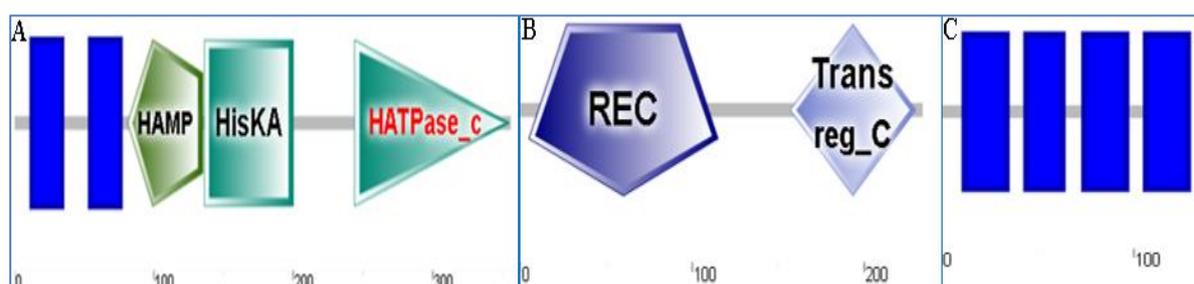
o CrrC apenas foi identificado o domínio transmembranar na posição 10 a 129 (figura 1C). Com auxílio da ferramenta PSORT (<http://psort1.hgc.jp/form.html>) localizou a proteína CrrA como proteína citoplasmática com sítio de ação próximo a membrana interna. A proteína CrrB foi localizada como proteína transmembranar e o CrrC como proteína de membrana interna. E por fim, foi utilizada a ferramenta TrSSP (<http://bioinfo.noble.org/TrSSP/>) para predição de da função de transporte para CrrC, a mesma não identificou qualquer domínio vinculados a proteínas transportadoras na sequência de aminoácidos do CrrC. Apenas o sensor CrrB foi identificado como proteína transportadora com substratos possíveis proteínas, RNAm e íons (tabela 7).

Tabela 7: Análise da localização, e funções de transporte e substrato específico das proteínas CrrA, CrrB e CrrC.

Determinantes de resistência	TrrS							PSORT
	A A	ÍONS	ELETRON	PROTEÍNA/ RNAm	AÇÚCAR	OUTROS	TRANSPORTE	
CrrA	N	N	N	N	N	N	N	Citoplasma Membrana interna/externa/ Periplasmática
CrrB	N	S	N	S	N	N	S	Menbrana interna
CrrC	N	N	N	N	N	N	N	Menbrana interna

LEGENDA: AA: aminoácidos; N: não; S: sim.

Figura 1 – Predição dos domínios das proteínas CrrB, CrrA e CrrC



LEGENDA: Os retângulos azuis representam os domínios transmembranais das proteínas CrrB e CrrC. HAMP: Histidina quinase, Adenilciclase, Receptor de grupo Metil, fosfatase, HisKA: domínio histidina quinase, HATPase_C: domínio fosfatase, REC: domínio receptor de sinal, Trans reg_C: domínio de ligação ao DNA. Fonte: A autora.

TIPAGEM POR MULTILOCUS SEQUENCE TYPING

Ao isolado *C. freundii* C156 foi atribuída a *sequence type* (ST) 117 pelo MLST *Citrobacter freundii* (tabela 8). O perfil alélico dos *loci* está apresentado na Tabela 2. A

ST117 não foi, até o presente, documentada em um isolado clínico *C. freundii* que tenha sido citado na literatura.

Tabela 8: Variantes alélicas dos *loci* gênicos do *Citrobacter freundii* C156 utilizados na tipagem por MLST.

PERFIL ALÉLICO							
<i>AspC</i>	<i>clpX</i>	<i>fadD</i>	<i>mdh</i>	<i>arca</i>	<i>DnaG</i>	<i>lysP</i>	ST
26	53	20	15	5	6	58	117

DISCUSSÃO

Os mecanismos de resistência às polimixinas descritos em membros da Enterobacteriaceae são em grande parte devido a mutações cromossômicas em genes reguladores de dois componentes (TCS) (JAYOL et al., 2017). Recentemente, um mecanismo mediado por plasmídeo foi descrito, o *mcr-1*, foi descrito em espécime de *E. coli* isoladas de alimentos, animais e humanos na China (LIU et al., 2016).

Esses mecanismos são complexos e ainda não estão completamente elucidados. Pesquisas recentes têm explicado diversos mecanismos e vias, anteriormente desconhecidos, que contribuem para a resistência às polimixinas em membros da Enterobacteriaceae (JAYOL et al., 2016). Entre esses mecanismos, o TCS CrrAB está relacionado a alto nível de resistência à colistina em isolados de *K. pneumoniae* apresentando CIM ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$ (WRIGHT et al., 2015; CHENG et al., 2016; JAYOL et al., 2017; CAIN et al., 2017).

A identificação do CrrAB realça o caráter multifacetado pelo qual as células respondem a pressão seletiva imposta pelos antimicrobianos (WRIGHT et al., 2015). O CrrAB atua na resposta ao estresse sofrido pela membrana externa bacteriana. Análises comparativas da região CrrAB demonstram que ele está presente em algumas linhagens de *K. pneumoniae* e ausente em outras, apesar de estar presente em outras espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter*. Contudo, Wright et al., 2015, relatam que esta região se encontra em contexto diferente genético quando comparado os genomas de *Enterobacter* e *Klebsiella*.

Neste estudo foi visto que o operon *crrAB* se apresenta no mesmo contexto genético descrito por Wright et al. (2015). No *C. freundii* C156 esta região se apresenta adjacente ao ABC transporte. O conteúdo GC da região dos genes *crr* é de aproximadamente

42%, muito mais baixo quando comparado com o conteúdo GC do cromossomo de *C. freundii* C156 que é de 51,58%. Esses resultados se alinham com os mencionados nos estudos feitos com estes genes (WRIGHT 2015; CHENG et al., 2016; JAYOL et al., 2017; CAIN et al., 2018)

Cheng et al. (201) descreve seis novas mutações no gene do sensor de histidina quinase (CrrB) em isolados clínicos de *K. pneumoniae* apresentando CIM de colistina maior que 500 µg/mL obtidos em Taiwan (CHENG et al., 2016). Esse resultado de CIM divergem dos encontrados por Wright et al. (2015), onde foi relatado CIM de 16 µg/mL. Contudo, um estudo epidemiológico conduzido por Jayol et al. (2017) relataram CIM \geq 500 µg/mL.

Neste estudo, o CIM de polimixina B encontrado foi de 128 µg/mL para o *C. freundii* C156. Foi identificada uma troca de único aminoácido localizada em um motivo altamente conservado entre gene ortólogos presente em *K. pneumoniae*, denominado de interface de dimerização do domínio HAMP do sensor de histidina quinase CrrB. Esse evento genético alinha-se com os resultados achados por Cheng et al. (2016), além dos outros estudos epidemiológicos que avaliaram isolados clínicos de *K. pneumoniae* com resistência às polimixinas e alterações no CrrB (WRIGHT et al., 2015, JAYOL et al., 2017).

Cheng et al. (2016) sugeriu o mecanismo de ação do CrrAB. Nesse estudo, através de análise de RNASeq, foi visto que em cepas de *K. pneumoniae* ST258 que tinha mutações em algum dos domínios do gene *crrB* o nível de expressão de PmrA. A análise do perfil do lipídio A demonstrou altera por radicais Lara4N, sugerindo que a via de modificação do LPS era a *anrT*. Durante o estudo, Cheng et al. (2016) relataram que em cepa *K. pneumoniae* com deleção do gene *crrC* atenuou a resistência à colistina, indicando que este gene pode atuar modelando a expressão do *arnT* e da PmrC, via regulação de PmrA.

A proteína CrrC é identificado na anotação genômica pelo RAST como um possível transportador. Contudo, a análise com auxílio da ferramenta TSRR evidencia que para sequência proteica não há qualquer substrato específico relacionado a proteína CrrC. A análise pelo SMART identifica a localização celular dessa proteína como acoplada a região interna da membrana celular bacteriana. Estes dados são corroborados pelos estudos de CHENG et al. (2016) em isolado clínico de *K. pneumoniae*.

Neste estudo foi encontrado uma única troca entre uma alanina por uma treonina na posição 91 (A91T) na sequência de aminoácido da proteína CrrB, localizando-se na interface de do domínio HAMP, que provavelmente está relacionada ao fenótipo de resistência apresentado pelo isolado clínico *C. freundii* C156. Estes achados por si só não comprovam a alteração do perfil de suscetibilidade da cepa C156. No entanto, são coerentes com estudos anteriores conduzidos em isolados de *K. pneumoniae* (WRIGHT et al., 2015; CHENG et al., 2016; JAYOL et al., 2017).

As interações entre *C. freundii* e indivíduos saudáveis são consideradas de naturezas não patogênicas. O *C. freundii* pertence um pequeno grupo de patógenos oportunista que frequentemente encontrados no ambiente hospitalares são capazes de causar uma variedade de infecções em indivíduos com doença crônicas (ANDERSON et al., 2018).

As infecções causadas por *C. freundii* são em geral polimicrobianas (LIU et al., 2017). Na maioria das vezes este patógeno é encontrado em associação com patógenos de interesse clínicos como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Pseudomonasaeruginosa*. Este fato pode mascarar o principal agente etiológico da infecção em curso, levando os clínicos a atuarem sobre os patógenos com maior destaque na clínica e ignorando a presença do *C. freundii*.

As análises para estudos do perfil de resistência do isolado clínico *C. freundii* demonstrou o potencial emergente desse patógeno para causar surtos no ambiente hospitalar. A presença de plasmídeos com o IncHI2 no qual foi identificado o Tn4401 que carrega o gene *blaKPC* e o fato desse patógeno ter sido isolado na mesma amostra clínica que foi isolada uma *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos, reforçam a teoria do alto potencial para adquirir e transferir genes de resistência a variadas classes de antimicrobianos.

A frequência de isolados hospitalares de *C. freundii* MDR teve um aumento considerável nos últimos 5 anos (LESKI et al., 2016). Liu et al. (2017) relataram alta prevalência de *C. freundii* de *qnr* e *aac(6')-Ib-cr*, 72% e 68,9% respectivamente. A análise do perfil de resistência apresentado por estes isolados apresentou que os *C. freundii* eram resistentes a no mínimo três antibióticos. Neste estudo foi relatado também a diversidade genética de *C. freundii* através da análise de MLST onde foram encontrados novos ST. Estes dados corroboram com os apresentando neste estudo para o perfil de resistência e é descrito aqui uma nova ST para a espécie *Citrobacter freundii*, ST117.

Estudos genômicos que identifique o perfil de resistência aos antimicrobianos são necessários e urgentes para implementação de políticas de controle e disseminação de patógenos MDR no ambiente hospitalar e como ferramenta auxiliar para o desenvolvimento de novas drogas ou melhoramento da terapêutica clínica.

AGRADECIMENTOS

A CAPES agência fomentadora da pesquisa, ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco (PPGMedTrop-UFPE) e a o grupo de pesquisa em Resistência Bacteriana do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhaes Recife-PE (IAM/Fiocruz-PE).

REFERÊNCIAS

- BARON, S. et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **Int J Antimicrob Agents**. EUA, p. 583-591. Dez. 2016.
- CAIN AK et al. Morphological, genomic and transcriptomic responses of *Klebsiella pneumoniae* to the last-line antibiotic colistin. **Scientific Reports**, EUA, p.1-11, 01 jun. 2018.
- CANNATELLI, A. et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. **Antimicrob Agents Chemother**. EUA, p. 5521-5526. Nov. 2013.
- CANNATELLI, A. et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. **Antimicrob Agents Chemother**. EUA, p. 5696-5703. Out. 2014.
- EL-HALFAWY OM, VALVANO MA. Antimicrobial Heteroresistance: an Emerging Field in Need of Clarity. **Clin. Microbiol. Rev**. EUA, p. 191-220, Jan.2015.
- CHENG Y-H et al. Amino Acid Substitutions of CrrB Responsible for Resistance to Colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. **Int J Antimicrob Agents**. EUA p. 3709-3716. Marc. 2016.
- GALES, AC. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**. EUA. p. 354-360. Ago. 2012.
- GIAMARELLOU, H. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. **Int J Antimicrob Agents**. EUA, p. 1-8. 25. Set. 2016.

GIANI, T. et al. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. **Euro Surveill.** Sweden, p. 16-30. Mar. 2013.

HASMAN, H. et al. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. **Euro Surveill.** Sweden, p. 1-5. Jan. 2015.

JAYOL A et al. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. **Antimicrob. Agents Chemother.** EUA, p. 2780-2784, May. 2015.

JAYOL A et al. High Level Resistance to Colistin Mediated by Various Mutations in the CrrB Gene Among *Klebsiella pneumoniae* Producing Carbapenemase. **Antimicrob Agents and Chemother.** EUA, p. e01423-17. Oct. 2017.

LIU, L et al. Genetic diversity, multidrug resistance and virulence of *Citrobacter freundii* from diarrheal patients and healthy individuals. **Front Cell Infect Microbiol**, Switzerland, p.01-10. Jul. 2018.

LIU, X et al. Complete Genome Sequence of Multidrug-Resistant *Citrobacter freundii* Strain P10159, Isolated from Urine Samples from a Patient with Esophageal Carcinoma. **Gen Announcements.** EUA, p. 1-2. Fev. 2016.

LIU, YY et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in Chi. **Lancet Infect Dis.** UK, p. 161-168. Fev. 2016.

MILLER, AK. et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. **Antimicrob Agents Chemother.** EUA, p. 5761-5769. Dez. 2011.

MOFFATT, JH. et al. Insertion sequence ISAbal1 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.** EUA, p. 3022-3024. Jun. 2011.

OLAITAN AO, MORAND S, ROLAIN J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Front Microbiol.** Switzerland, p. 1-18. Nov. 2014.

OLAITAN, AO. et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. **Int J Antimicrob Agents.** EUA. p. 500-507. Dez. 2014.

OLAITAN, AO.; MORAND, S.; ROLAIN, Jn. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. **Int J Antimicrob Agents.** EUA. p. 1-3. Jan. 2016.

POIREL, L et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother.** UK. p. 75-80. Jan. 2015.

POIREL L., JAYOL A, NORDMANN P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clin Microbiol Rev.**, EUA, v. 2, n. 30, p.557-596, Abr. 2017.

POUDYAL A et al. In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother.** UK, p. 1311-1318. Dez. 2008.

SAMPAIO, JLM; GALES, AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Braz. J. Microbiol.** Brazil, p. 31-36. Dez. 2016.

SATO, Toyotaka et al. Pathogenic Lineage of mcr-Negative Colistin Resistant *Escherichia coli*, Japan, 2008–2015. **Emerg Infect Dis.** EUA, p.2223-2225. Dez. 2016. Carta ao editor.

WRIGHT MS et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** EUA, p. 536-543. Nov. 2015.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O alto nível de resistência a colistina apresentado pelo isolado *C. freundii* C156 pode está relacionado à mutação de único aminoácido encontrado no domínio HAMP do sensor CrrB.
- A presença de genes de resistência bem conversados como *blaCTX-M-15*, *blaTEM-1B*, *blaCMY-41*, *OXA-48* e *qnrB* colocam o *C. freundii* C156 como MDR.
- O *C. freundii* C156 foi caracterizado como ST117, uma nova ST corroborando com a diversidade genética relatada para esta espécie.
- A presença de plasmídeo apresentando IncHI2, IncHI2A e ColRNAI que apresentam alta plasticidade e caracteriza o *C. freundii* C156 como possível reservatório de determinantes de resistência.

REFERÊNCIAS

- ABBOUD, CS et al. Post-surgical mediastinitis due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Clinical, epidemiologica. **Int J Antimicrob Agents**. EUA, p. 386-390. Abr. 2016.
- AGRESO, Y et al. Tentative colistin epidemiological cut-off value for *Salmonella* spp. **Foodborne Pathog Dis**. p. 367-369. 02 fev. 2012.
- AGUAYO, A. et al. Colistin en la era post-antibiótica. *Rev Chilena Infectol*, v. 33, n. 2, p.166-176, Jan. 2016.
- AH, YM; KIM, AJ; LEE, JY. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Int J Antimicrob Agents**. EUA, p. 8-15. 01 jul. 2014.
- AL-ALOUM M et al. Renal impairment in cystic fibrosis patients due to repeated intravenous aminoglycoside use. **Pediatr. Pulmonol**. 39(1), p. 15–20, 2005.
- ANTONELLI, A. et al. OXA-372, a novel carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from a *Citrobacter freundii* isolated from a hospital wastewater plant. **J Antimicrob Chemother**. EUA, p. 2749-2756. Jun. 2015.
- BARON, S. et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **Int J Antimicrob Agents**. EUA, p. 1-9. Ago. 2016.
- BECEIRO, A. et al. Biological Cost of Different Mechanisms of Colistin Resistance and Their Impact on Virulence in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**. EUA, p. 518-526. Jan. 2014.
- BECEIRO, A. et al. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**. EUA, p. 3370-3379. 01 jul. 2011.
- BRENNER, DJ. et al. Biochemical Identification of *Citrobacter* Species Defined by DNA Hybridization and Description of *Citrobacter gillenbergii* sp. nov. (Formerly *Citrobacter* Genomospecies 10) and *Citrobacter murliniae* sp. nov. (Formerly *Citrobacter* Genomospecies 11). **J of Clinical Microbiology**. EUA, 37 (8). p. 2619-2624. Ago. 1999.
- BROOKS, GF. et al. **Microbiologia médica: De Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26. ed. Eua: Mc Graw Hill, 2014. 872 p.
- CANNATELLI, A. et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. **Antimicrob Agents Chemother**. EUA, p. 5521-5526. Nov. 2013.
- CANNATELLI, A. et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. **Antimicrob Agents Chemother**. EUA, p. 5696-5703. Oct. 2014.

CANNATELLI, A. et al. In vivo evolution to colistin resistance by PmrB sensor kinase mutation in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* is associated with low-dosage colistin treatment. **Antimicrob Agents Chemother.** EUA, p.4399-4403, May. 2014.

CANTON, R. et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. **Clinical Microbiology And Infection.** p. 413-431. May. 2012.

CHARAN, J. et al. New Delhi Metallo – beta lactamase – 1 containing Enterobacteriaceae: Origin, Diagnosis, Treatment a. **Pan African Medical Journal.** p. Feb. 2012.

CHENG Y-H et al. Amino Acid Substitutions of CrrB Responsible for Resistance to Colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. **Int J Antimicrob Agents.** EUA, p. 3709-3716. Marc. 2016.

CHUANG, YM. et al. Emergence of cefotaxime resistance in *Citrobacter freundii* causing necrotizing fasciitis and osteomy. **British Journal of Infection.** p. 161-163. Jan. 2006.

COETZEE, J. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance (MCR-1) among *Escherichia coli* isolated from South African patients. **S Afr Med J.** p. 35-36. Abr. 2016.

DARAM SR, GOGIA S, BASTANI B: Colistin-associated acute renal failure: revisited. **South Med J.** p. 257-258, 2005.

DERYKE CA, CRAWFORD AJ, UDDIN N, WALLACE MR. Colistin dosing and nephrotoxicity in a large community teaching hospital. **Antimicrob. Agents Chemother.** 54(10), p. 4503–4505, 2010.

DORAN, TI. The Role of *Citrobacter* in Clinical Disease of Children: Review. Texas: e Infectious Diseases Society Of America, 1999. 10 p.

DOUMITH, M. et al. Detection of the plasmid-mediated mcr-1 gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. **J Antimicrob Chemother.** p. 2300-2305. Ago. 2016.

ETHERINGTON C. Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) in adults with CF-a marker of nephrotoxicity? **J. Cyst. Fibros.** 3(Suppl. 1), S49 2004.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC); 2014. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm, Sweden: ECDC. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf> [Accessado em 20 Novembro 2017].

FALAGAS ME et al. Toxicity after prolonged (more than four weeks) administration of intravenous colistin. **BMC Infect. Dis.** 5, 1, 2005.

FALAGAS ME, KASIAKO SK: Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Clin Infect Dis.** p 1333-1341, 2005.

FALAGAS ME, KASIAKOU SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care*. R27, 2006.

FERNANDEZ AB, PEREZ M, SOTO L. Sudden respiratory muscle paralysis and apnea in a patient infected with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* treated with intravenous colistin. *Int J Infect Dis*. p. 317-351, 2013.

FENG, J. et al. Coexistence of a novel KPC-2-encoding MDR plasmid and an NDM-1-encoding pNDM-HN380-like plasmid in a clinical isolate of *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother*. p. 2987-2991. jul. 2015.

FOMDA, BA.; KHAN, A.; ZAHOOR, D. NDM-1 (New Delhi metallo beta lactamase-1) producing Gram-negative bacilli: Emergence & clinical imp. *Indian J Med Res*. p. 672-678. nov. 2014.

GAIBANI, P. et al. Outbreak of *Citrobacter freundii* carrying VIM-1 in an Italian Hospital, identified during the carbapenemases screening actions, June 2012. *Int J Infect Dis*. p. 714-717. 01 set. 2013.

GALES, AC. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis*. p. 354-360. ago. 2012.

GALES, AC.; JONES, RN.; SADER, HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of G. *Clinical Microbiology And Infection*. p. 315-321. abr. 2006.

GALES, AC.; JONES, RN.; SADE, HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pa. *J Antimicrob Chemother*. p. 2070-2074. jun. 2011.

GIAMARELLOU, H. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. *International Journal Of Antimicrobial Agents*. p. 1-8. set. 2016.

GIANI, T. et al. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. *Euro Surveill*. p. 1-6. mar. 2013.

GIRARDELLO, R.; GALES, Ac.. Resistência às polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, v. 2, n. 2, p.66-69. jan. 2012.

GÓMEZ-GIL, MR. et al. Detection of KPC-2-producing *Citrobacter freundii* isolates in Spain. *J Antimicrob Chemother*. p. 2695-2697. dez. 2010.

HARTZELL JD et al. Nephrotoxicity associated with intravenous colistin (colistimethate sodium) treatment at a tertiary care medical center. *Clin. Infect. Dis*. 48(12), 1724–1728, 2009.

- HASMAN, H. et al. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. **Euro Surveill.** p. 1-5. jan. 2015.
- HUANG, YM et al. NDM-1-Producing *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, and *Acinetobacter baumannii* Identified from a Single Patient in China. **Antimicrobial Agents Chemother.** p. 5073-5077. jun. 2015
- JAMAL, WY.; ALBERT, MJ.; ROTIMI, VO. High Prevalence of New Delhi Metallo- β -Lactamase-1 (NDM-1) Producers among Carbapenem-Resistant Ente. **Plos One.** p. 1-12. mar. 2016.
- JAYOL, A et al. Modulation of *mgrB* gene expression as a source of colistin resistance in *Klebsiella oxytoca*. **Int J Antimicrob Agents.** p. 108-110. jul. 2015.
- JAYOL A et al. Acquisition of broad-spectrum cephalosporin resistance leading to colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.** p. 3199-3201, 2016.
- KALLEL H, et al. Suspected acute interstitial nephritis induced by colistin. **J Nephrol.** p 323-326, 2005.
- KANAMORI, H. et al. High prevalence of extended-spectrum β -lactamases and *qnr* determinants in *Citrobacter* species from Japan: dissemination of CTX-M-2. **J Antimicrob Chemother.** p. 2255-2262. jul. 2011.
- KEMPF, I. et al. What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? **Int J Antimicrob Agents.** p. 379-383. 26 set. 2013.
- KIMURA, K. et al. Genome sequencing, annotation of *Citrobacter freundii* strain GTC 09479. **Genome Data.** p. 40-41. mar. 2014.
- KO H et al. Early acute kidney injury is a risk factor that predicts mortality in patients treated with colistin. **Nephron. Clin. Pract.** 117(3), c284–c288, 2011.
- KONEMAN et al. **Diagnóstico microbiológico. Texto e Atlas colorido.** 6^a ed. MEDSI. Rio de Janeiro p. 946. 2008.
- KOX, LF.; WÖSTEN, MM.; GROISMAN, EA. A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. **Embo J.** p. 1861-1872. 17 abr. 2000.
- KWON JA et al. Predictors of acute kidney injury associated with intravenous colistin treatment. **Int. J. Antimicrob. Agents** 35(5), p. 473–477. 2010.
- KUMARASAMY, KK. et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biol. **Lancet Infect Dis.** p. 597-602. set. 2010.
- KUO, SC. et al. Colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* isolates from humans and retail meats, Taiwan. **J Antimicrob Chemother.** p. 2327-2329. ago. 2016.

LAVIGNE, J. et al. Clinical and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Citrobacter* spp. infections in a French university hospital. **Eur J Clin Microbiol Infect** **di**. p. 439-441. maio 2007.

LEWIS JR, LEWIS SA: Colistin interactions with the mammalian urothelium. **Am J Physiol Cell Physiol**.p C913-C922, 2004.

LI, A. et al. Complete Sequences of mcr-1-Harboring Plasmids from Extended-Spectrum- β -Lactamase and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**. p. 4351-4354. jun. 2016

LI, G. et al. Novel genetic environment of the plasmid-mediated KPC-3 gene detected in *Escherichia coli* and *Citrobacter freundii* isolates from China. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. p. 575-580. abr. 2011.

LI, H. et al. Molecular characteristics of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in China from 2008 to 2011. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**. p. 63-65.out. 2014.

LIU, L et al. Genetic diversity, multidrug resistance and virulence of *Citrobacter freundii* from diarrheal patients and healthy individuals. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 233, n. 8, p.01-10, Jul 2018.

LIU, X et al. Complete Genome Sequence of Multidrug-Resistant *Citrobacter freundii* Strain P10159, Isolated from Urine Samples from a Patient with Esophageal Carcinoma. **Genome Announcements**. p. 1-2. fev. 2016.

LIU, YY et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in Chi. **Lancet Infect Dis**. Europa, p. 161-168. fev. 2016.

LOCKHART, SR. et al. Antimicrobial Resistance among Gram-Negative Bacilli Causing Infections in Intensive Care Unit Patients in the United States between 1993 and 2004. **J Clin Microbiol**. p. 3352-3359. out. 2007.

LUO, Y. et al. Characterization of KPC-2-producing *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella oxytoca* isolates from a Chinese Hospital. **Microb Drug Resist**. p. 264-269. ago. 2014.

MICHALOPOULOS AS et al. Colistin treatment in patients with ICU-acquired infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria: the renaissance of an old antibiotic. **Clin Microbiol Infect**. p. 115-121, 2005.

MILLER, AK. et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. **Antimicrob Agents Chemother**. p. 5761-5769. dez. 2011.

MITROPHANOV, AY. et al. Evolution and dynamics of regulatory architectures controlling polymyxin B resistance in enteric bacteria. **Plos Genet**. p. 1-11. out. 2008.

MOFFATT, JH. et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. **Antimicrob Agents Chemother.** p. 4971-4977. dez. 2010.

MOFFATT, JH. et al. Insertion sequence ISAbal1 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.** p. 3022-3024. jun. 2011.

MOHANTY, S et al. *Citrobacter* infections in a tertiary care hospital in Northern India. **British Journal Of Infection.** p. 54-68. jan. 2007.

MONACO, M. et al. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. **Euro Surveill.** p. 1-5. out. 2014.

MOSKOWITZ, Sm. et al. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. **Antimicrob Agents Chemother.** p. 1019-1030. fev. 2012.

MULLER, C.; PLÉSIAT, P.; JEANNOT, K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** p. 1211-1221. mar. 2011.

MURRAY, Patrick R. et al. **Microbiologia médica.** 7. ed. Iowa: Saunders, 2013. 966 p.

NATION RL, Li J. **Colistin in the 21st century.** Curr Opin Infect Dis. p. 535-543, 2009.

NIGAM A et al. Colistin neurotoxicity: revisited. BMJ Case Rep. 2015.

NGUYEN, NT. et al. Use of Colistin and Other Critical Antimicrobials on Pig and Chicken Farms in Southern Vietnam and Its Association with Resistance in Commensal *Escherichia coli* Bacteria. **Appl Environ Microbiol.** p. 3727-3735. jun. 2016.

NORDMANN, P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge. **Médecine Et Maladies Infectieuses.** p. 51-56. dez. 2013.

OLAITAN, AO. et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. **Int J Antimicrob Agents.** p. 500-507. dez. 2014.

OLAITAN AO, MORAND S, ROLAIN J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol. p. 643-645, 2014.

OLAITAN, AO.; MORAND, S.; ROLAIN, Jn.. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. **Int J Antimicrob Agents.** p. 1-3. jan. 2016.

PARK, YJ. et al. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases among chromosomal AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens* in

Korea and investigation of screening criteria. **Diagn Microbiol Infect Dis.** p. 265-269. abr. 2005.

PEPPERELL, C. et al. Low-Virulence *Citrobacter* Species Encode Resistance to Multiple Antimicrobials. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy.** p. 3555-3560. nov. 2002.

PETER, S. et al. Emergence of *Citrobacter freundii* carrying IMP-8 metallo- β -lactamase in Germany. **New Microbes And New Infection.** p. 42-45. mar. 2014.

PETROSILLO N et al. Combined colistin and rifampicin therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: clinical outcome and adverse events..**Clin Microbiol Infect.** p. 682-682 (11), 2005.

POIREL, L. et al. Extremely drug-resistant *Citrobacter freundii* isolate producing NDM-1 and other carbapenemases identified in a patient returning from India. **Antimicrob Agents Chemother.** p. 447-448. jan. 2011.

POIREL, L et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Antimicrob. Chemother.** p. 75-80. jan. 2015.

PRIM, N. et al. Detection of *mcr-1* colistin resistance gene in polyclonal *Escherichia coli* isolates in Barcelona, Spain, 2012 to 2015. **Euro Surveill.** p. 1-3. jan. 2016.

QUESADA, A. et al. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. **J Antimicrob Chemother.** p. 71-74. jan. 2015.

RHOUMA, M. et al. In vivo therapeutic efficacy and pharmacokinetics of colistin sulfate in an experimental model of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in weaned pigs. **Vet Res,** v. 58, n. 47, p.1-11, jan. 2016.

ROCHA, Iv et al. Ciprofloxacin-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST410 strain carrying the *mcr-1* gene associated with bloodstream infection. **Int J Antimicrob Agents,** Recife, v. 49, n. 5, p.655-656, maio 2017.

ROSSI, F et al. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. **Braz J Infect Dis.** p. 1-4. set. 2016.

SAMONIS, G. et al. *Citrobacter* infections in a general hospital: characteristics and outcomes. **Eur J Clin Microbiol Infect di.** p. 61-68. ago. 2008.

SAMPAIO, JLM; GALES, AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Braz J Microbiol.** São Paulo, p. 1-7. 15 out. 2 SATO, Toyotaka et al. Pathogenic Lineage of *mcr*-Negative Colistin Resistant *Escherichia coli*, Japan, 2008–2015. **Emerging Infectious Diseases.** v. 22, n. 12, p.2223-2224, dez. 2016. Carta ao editor.

SPAPEN H et al. Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients. **Ann Intensive Care.** p. 1-14 2011.

SKOV, RI.; MONNET, DI. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. **Euro Surveill.** p. 1-6. jan. 2016.

TORTORA, GJ.; FUNKE, BR.; CASE, CL. **MICROBIOLOGIA.** 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967.

WADIA S, TRAN B. Colistin-mediated neurotoxicity. **BMJ Case Rep.** 2014.

WALSH, Tr. et al. Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? **Clin Microbiol Rev,** v. 18, n. 2, p.306-325, abr. 2005.

WAHBY K, CHOPRA T, CHANDRASEKAR P. Intravenous and inhalational colistin-induced respiratory failure. **Clin Infect Dis.** 50:38-40, 2010.

WRIGHT MS et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** EUA, p. 536-543. Nov. 2015.

WU, W. et al. *Citrobacter freundii* carrying blaKPC-2 and blaNDM-1: characterization by whole genome sequencing. **Nature.** p. 1-4. 28 jul. 2016.

WUNSCH H et al. Polymyxin use associated with respiratory arrest. **Chest.** 141:515-517, 2012.

YE, H. et al. Diversified mcr-1-Harboring Plasmid Reservoirs Confer Resistance to Colistin in Human Gut Microbiota. **Mbio.** p. 1-7. abr. 2016.

XU, Y et al. Epidemiology of carbapenem resistant Enterobacteriaceae (CRE) during 2000-2012 in Asia. **J Thorac Dis.** Hong Kong, p. 376-385. mar. 2015.

APÊNDICE A – ARTIGO – SINGLE CHANGE IN THE HISTINE SENSOR KINASE CrrB CAUSING RESISTANCE TO POLYMYXINS IN CLINICAL ISOLATE OF *CITROBACTER FREUNDII*

Gabriela I R de Araujo¹; Maria Amélia V Maciel¹; Danilo E Xavier²

- 1 Laboratory of Bacteriology and Molecular Biology - Department of Microbiology - Health Sciences Center - Federal University of Pernambuco.
- 2 Department of Microbiology - Aggeu Magalhães Institute - Oswaldo Cruz Foundation - FIOCRUZ-PE.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance has become a major global public health problem. The rapid emergence and spread of multidrug resistant drugs (MDRs), including carbapenems, have resurfaced as polymyxins as a last option in the treatment of severe graves caused by MDR pathogens. However, resistance to polymyxins has been rising rapidly. The effects of polymyxin resistance are the study of genome to the major understanding and anchoring measures of control of their dissemination. In this work genotypic approach was performed to characterize the determinant of colitis resistance in *Citrobacter freundii*. Gene sequencing allowed for identification of a single mutation in the HAMP domain of the TCS sensor CrrB, recently described in *Klebsiella pneumoniae*. In silico comparative studies of resistance determinants have no genome of anticoagulation and dissemination of this force in the hospital environment. This allows an adoption of propagation control of resistant and effective efforts of the clinical treatment adopted.

INTRODUCTION

The increase in infections caused by multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria and the lack of a new drug potentially active against these pathogens has led the medical community to use old drugs such as polymyxins (GIAMARELLOU, 2016). However, the

increase and inappropriate use of this drug has led rigorously to the appearance of polymyxin resistant bacteria, especially Enterobacteriaceae (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014).

The emergence and spread of carbapenem resistant Enterobacteriaceae (Carbapenem resistant Enterobacteriaceae - CRE) is the major concern both in clinical and public health (GALES et al., 2012). The emergence of different enzyme variants capable of hydrolyzing this group of antimicrobials, known as carbapenemases, has led to the resurgence of old drugs as the last option of viable treatment.

Studies of mechanisms of resistance to polymyxins show that chromosomal mutations are frequently implicated in the acquisition of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (MILLER et al., 2011), *Acinetobacter baumannii* (MOFFATT et al., 2011) and, more recently, *Klebsiella pneumoniae* (GAIBANI et al., 2014; POIREL et al., 2015). Most of these mechanisms are directed to the modification of lipid A, the basal portion of lipopolysaccharide (LPS), which is the first target of polymyxins (GALES et al., 2012). Mechanisms associated with polymyxin resistance may be diverse in different bacterial genera, but most often follow a common pathway of lipid A modification, with addition of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (Lara4N) and / or of phosphoethanolamine (PEtN) (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2016).

The addition of Lara4N is coordinated by the *arnBCADTEF* operon. This operon is finely regulated by two-component systems (TCS), mainly PhoPQ and PmrAB (OLAITAN et al., 2016). And mutations in TCS PhoPQ and PmrAB have been described in *Salmonella* spp., *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014). These mutations lead to the constitutive activation of TCS and subsequently increase the expression of the genes regulated by these regulatory systems, which causes Lara4N addition to lipid A (BARON et al., 2016).

The mutations described in the PmrAB TCS generally occur in the protein kinase PmrB, which causes the PmrA regulator to not be dephosphorylated. The PmrA regulator is also activated indirectly by TCS PhoPQ through the PmrD protein, which appears to act to avoid dephosphorylation of PmrA (OLIATAN et al., 2014). The regulatory system PmrAB acts on the activation of the *arnCABDTEF* operon thus conferring resistance to polymyxins through the addition pathway of Lara4N, but also acts on the activation of the *pmrCAB* operon which increases the expression of *pmrC*, which is a phosphoethanolamine (PEtN) transferase, responsible for the addition of PEtN to lipid A (BARON et al., 2016).

Another mechanism described in clinical isolates of *K. pneumoniae* consists of Mutations or Insertion Sequence (IS) in the genetic determinant *MgrB* that inactivates this protein and increases the resistance between these isolate (CANNATELLI et al., 2013; CANNATELLI et al., 2014). This protein acts by negative feedback on the PhoQ, causing that there is no phosphorylation of its regulatory correlator PhoP and consequently the non-activation of its regulated genes (Poriel et al., 2015). Olaitan et al. (2014) reported that *MgrB* inactivation by IS insertion led to the increase of polymyxin-resistant clinical isolates of *K. pneumoniae* in LAO, Thailand, Nigeria, Israel and France.

Resistance to polymyxins had been reported only with chromosomal mechanisms that did not allow horizontal transfer until very recently. More recently, a plasmid-mediated mechanism, *Mcr-1* (Mechanism Colistin Resistance) (HASMAN et al., 2015) has been described. This gene was first described in pig *E. coli* isolates in China (LIU et al., 2016). The fact that this gene is plasmid-mediated has clinical implications, because in addition to rapid dissemination, these plasmids generally confer resistance to other antimicrobials, leading to an outbreak of bacteria called panresistants and failure of antimicrobial therapy on a global scale (BORAN et al., 2016; LIU et al., 2016).

The heteroresistance can be defined as a subset of isogenic populations of bacteria that have a different susceptibility profile to antibiotics (CAIN et al., 2018). Heteroresistance has been considered an indicator in the rapid acquisition of resistance, this results in therapeutic failure (EL-HALFAWY; VALVANO, 2015). However, the actual impact of this phenotype on bacterial resistance still is poorly understood because of the difficulty of detecting bacterial subpopulations using standard laboratory methods (JAYOL et al., 2015).

For poliximixins, heteroresence was studied phenotypically in *K. pneumoniae* and the genetic basis of heteroresistance may be related to mutations (SNPs or tandem gene duplications) in TCSs confer colR in Gram-negative strains (POUDYAL et al., 2008).

Increasingly understanding the mechanisms involved in polymyxin resistance is extremely vital and timely to facilitate the development of new antimicrobials that are potent in combating clinically relevant BGN-MDRs (ROSSI et al., 2016). Therefore, in view of the above, it is necessary the molecular study of the resistance mechanism presented by the isolate of *Citrobacter freundii* highly resistant to colistin for the adoption of prophylactic measures of clinical interest and to avoid the propagation of bacteria resistant to colistin and the therapeutic failure.

MATERIALS AND METHODS

ISOLATION AND SUSCEPTIBILITY PROFILE

The clinical isolate *Citrobacter freundii* C156 was obtained from a pleural fluid sample from a 76-year-old male patient attending the medical clinic of a reference hospital in Recife-PE. The identification of the species and the initial susceptibility profile were performed by VITEK2 (bioMérieux).

The polymyxin B sensitivity test was carried out using the broth microdilution technique according to CLSI recommendations (2010) and interpreted according to EUCAST criteria (<http://www.eucast.org/>). The strains *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality control of the test. For positive control, the MIC for *E. coli* C153 resistant to polymyxin and *mcr-1* positive was determined (ROCHA, et al., 2017). The identification and species of the specimen under study were confirmed using the MALDI Biotyper system (Copyright Bruker 2018). Through the analysis of characteristic patterns of abundant proteins for identification of the species.

SEQUENCING OF THE GENOME OF *Citrobacter freundii*

The bacterial genome of strain *C. freundii* C156 was sequenced using the Nextera XT Library Preparation Protocol according to the manufacturer's instructions (Illumina Inc, USA). The sequencing reaction occurred in the MiSeq Sequencing System (Illumina Inc.) at the IAM Technological Platforms Center, according to the parameters indicated in the MiSeq System User Guide.

IN SILICO ANALYSIS OF THE DETERMINANTS OF RESISTANCE TO COLISTIN, RESISTANCE, PLASMIDIAL PROFILE AND MLST

Assembling and annotating the genome was done with SPAdes tools 3.9 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SPAdes/>) and RAST (<http://rast.nmpdr.org>), respectively. The sequences of the contigs were analyzed by the tool BLASTn against the MLST 2.0 database *Citrobacter freundii*, ResFinder 3.0 and PlasmidFinder 1.3 from the Center of Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services>) for MLST typing, identification of determinants of antimicrobial resistance and presence of plasmids, respectively. To investigate the possible genetic determinants associated with the resistance of the *C.*

freundii C156 isolate to polymyxins, several loci previously related to this resistance phenotype in the Enterobacteriaceae family were analyzed in their genome in comparison to multiple sequence alignment using BLAST variants with genomes and sequences available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI - National Center for Biotechnology Information). To predict changes in protein function, the Provean tool (<http://provean.jcvi.org/index.php>) was used.

With the aid of the SMART tool (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) was identified the sequences of the domains of the determinants of resistance to colistin researched in this work. The PSORT tool (<https://psort.hgc.jp>) was used to predict cell location of the CrrC, CrrB and CrrA proteins. Finally, the TrSSP tool (<http://bioinfo.noble.org/TrSSP/>) was used to predict the transport function for CrrC.

RESULTS

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TEST

The isolate of *C. freundii* C156, presenting resistance to colistin with a minimum inhibitory concentration (MIC) ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ and susceptibility to carbapenems MIC ≤ 0.25 $\mu\text{g/mL}$, determined by Vitek2 (bioMérieux), was obtained in liquid culture pleural disease of a 76-year-old male patient admitted to a reference university hospital in the Metropolitan Region of Recife with an initial diagnosis of respiratory tract infection. Identification of the *C. freundii* species was confirmed by MALDI Biotyper and its genome analysis. In the same sample, a carbapenem resistant strain of MIC of ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$, Colistin sensitive, MIC of ≤ 0.25 $\mu\text{g/mL}$ (table 1) was isolated.

The CIM of polymyxins B by the broth microdilution method for the *C. freundii* C156 isolate was 128 µg / mL, confirming the phenotype of high-level polymyxin resistance if we consider that Enterobacteriaceae species are classified as resistant presenting a MIC of polymyxin B or colistin equal to 2 µg / mL, according to EUCAST.

Table 1: Antimicrobial susceptibility profile determined by Vitek2.

ANTIMICROBIAL	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	MIC	MIC
Cefepime	8	≥ 64
Cefoxitin	1	≥ 64
Ceftazidime	16	≥ 64
Ceftriaxone	≥ 64	≥ 64
Cefuroxime	≥ 64	≥ 64
Ciprofloxacin	1	≤ 0,25
Colistin	≥ 16	≤ 0,5
Ertapenem	≤ 0,5	-
Imipenem	≤ 0,25	≥ 16
Meropenem	≤ 0,25	≥ 16
Gentamicin	≥ 16	≤ 1
Piperacilin/Tazobactan	4	≥ 128
Tigecycline	1	≥ 8

NOTE: All MICs are in µg / ML. MIC: minimum inhibitory concentration

ANALYSIS OF GENOMIC SEQUENCING AND COMPARISON WITH GENOMES

REFERENCE OF *Citrobacter freundii*

In the tangent analysis the quality of the sequencing was obtained by the FASTQ program, which showed a good quality for the *C. freundii* C156 genome. As for assembling the genome using SPAdes 3.9 (<http://bioinf.spbau.ru/spades>), 275 contigs were obtained, with the largest contig size being 224,597 bases and N50 of 59,333, GC content of 51.58% and size of the total genome of 5,134,774 bases, consistent with the genomes described in the literature for *C. freundii* (Table 2).

Table 2: Result of assembly of the genome of strain C156.

QUALITY PARAMETERS	RESULTS
CONTIG NUMBERS	275
N50	59.333
CONTIG OF LARGER LENGTH	224.597
CONTIG > 1K	193
NUMBER BASES IN CONTIGS > 1K	5.096.078
LENGTH OF THE GENOME	5.134.774

K, kilobases

The genome of *C. freundii* strain C156 was compared to the wild-type genomes of *C. freundii* CFNIH1 (NZ_CP007557.1) and CAV1321 (NZ_CP011612.1) because they were fully assembled and frequently used as references in other studies by different research groups, besides being sensitive to polymyxins. The characteristics of their genomes are shown in Table 3.

Table: 3: Comparison of the genome of C156 and the genomes of *Citrobacter freundii* available in the NCBI.

GENOMIC CHARACTERISTICS	C156	CFNIH1	CAV1321
Size genome	5.134.774	5.371.330	5.489.4000
GC contente	51,58%	52,2%	51,56%
CDS Numbers	4.841	5.092	5.250

Legend: GC, Guanine and Cytosine; CDS, Coding Sequence.

ANALYSIS OF RESISTOMA AND PLASMIDIAL PROFILE

The search for genetic determinants of antimicrobial resistance and the presence of plasmids by ResFinder 2.1 shown in Table 4. PlasmidFinder 1.3 plasmid analysis resulted in the incompatibility group plasmids IncH2 (BX664015), RepA (CP011611), ColRNAI (DQ298019) and IncHI2A (BX664015), as shown in table 5.

Table 4: Resistance genes found in the genome of *Citrobacter freundii* C156.

ANTIMICROBIALS	RESISTANCE GENES	IDENTITY (%)	COVERAGE (%)
Aminoglycosides	<i>aa(3)-la</i> ,	99,7	100 (861/861)
	<i>aac(5')-lbcr*</i>	100	100 (600/600)
	<i>aadA1</i>	99,75	100 (837/837)
	<i>strAB</i>	100	100 (804/804)
Fluoroquinolones	<i>qnrB1</i>	99.85	99.85 (682/681)
	<i>aac(5')-lbcr*</i>	100	100 (600/600)
Betaactam	<i>bla_{CTX-M-15}</i>	100	100 (876/876)
	<i>bla_{TEM-1B}</i>	100	100 (861/861)
	<i>bla_{OXA-1}</i>	100	100 (831/831)
	<i>bla_{CMY-41}</i>	99.30	100 (1146/1146)
Fenicol	<i>catA1</i> ;	99.85	99.85 (655/660)
	<i>catB3</i> ;	100	100 (549/549)
Sulfonamides	<i>sul2</i>	100	100 (816/816)
Trimetopim	<i>dfA14</i>	99.59	100 (483/483)
Tetracyclines	<i>tet(34)</i>	81.36	

Note: Analyzes were performed using the ResFinder 2.1 tool (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>).

Table 5: Search of *Citrobacter freundii* C156 plasmids and their incompatibility groups.

Plasmid Access number	Identity (%)	Coverage (%)	Contig	NOTE
<i>IncHI2</i> (BX664015)	100,0	100 (327/327)	NODE_48_length_36327_cov_4.20989	-
<i>RepA</i> (CP011611)	80,3	100 (596/596)	NODE_48_length_36327_cov_4.20989	pKPC-CAV1321
<i>ColRNAI</i> (DQ298019)	100,0	100 (130/130)	NODE_113_length_9420_cov_28.8044	-
<i>IncHI2A</i> (BX664015)	100,0	100 (630/630)	NODE_120_length_7076_cov_3.43949	-

Note: Analyze was performed using the PlasmidFinde.1.3 tool (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>).

ANALYSIS OF POLYMYXIN RESISTANCE DETERMINANTS

Comparative analysis of orthologous genes of *C. freundii* C156 and Enterobacteriaceae associated with the resistance to polymyxins listed in Table 6 revealed mutations that resulted in substitutions in some amino acids of their proteins when compared to those of wild strains. The sequences of proteins with amino acid substitutions were subjected to protein function analyzes by the Provean tool, which has the power to infer whether such changes would be deleterious or neutral to their functions. Among all the proteins tested here, the A91T amino acid substitution in *C. freundii* C156 CrrB protein was the only one that, with statistical significance given by the test, appears to be deleterious to its function (Table 06).

Table 6: Homology analysis of the genetic determinants involved in resistance to polymyxins.

Determinants of resistance	Product/Function	Reference Genes (NCBI)	Identity	Positivity	Variant	Prediction functional
PhoP	Regulator	CP026238.1	100%	100%	-	-
PhoQ	Sensor	CP012554.1	100%	100%	-	-
PmrA	Regulator	WP_003031849.1	100%	100%	-	-
PmrB	Sensor	WP_032938137.1	100%	100%	-	-
PmrC/EptA	Phosphoethanol amtransferase		99%	99%	S254G	Neutral
PmrD	Regula PmrA		99%	99%	A60V	Neutral
MgrB	Regula de PhoP	WP_038641290.1	98%	100%	V12I	Neutral
EptB	Phosphoethanol amtransferase		100%	100%	-	-
CrrA	Regulator	WP_048234170.1	99%	99%	T21K	Neutral
CrrB		WP_071684973	99%	99%	A91T	Deleterious

C. freundii strain C156 did not show significant changes in the other determinants related to resistance of enterobacteria to polymyxins and was negative for plasmid genes of resistance to polymyxins, *mcr-1* and variants. The *crrB* gene encodes a histidine kinase sensor of TCS CrrAB, present in some strains of several species of Enterobacteriaceae. Previous studies using *K. pneumoniae* as a model correlate changes in CrrB to the phenotype of colistin resistance in *Klebsiella*.

The functional domains of CrrA, CrrB and CrrC proteins were predicted with the help of the SMART tool (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). For the CrrB protein, two transmembrane domains, positions 12/34 and 54/76, HAMP (Histidine kinases, Adenyl cyclases, Methyl-accepting proteins and Phosphatases) located 81 to 135, Histidine kinase (HISKA), 136 to 200 and or phosphatase (HATPase_c), 244 to 353 (Figure 1A). In contrast, the CrrA regulator showed the signal receptor domain (REC) located between positions 8 and 119 and the DNA binding domain (Trans reg_C) at position 161 to 230 (Figure 1B). For CrrC only the transmembrane domain was identified at position 10 to 129 (Figure 1C). With the help of the

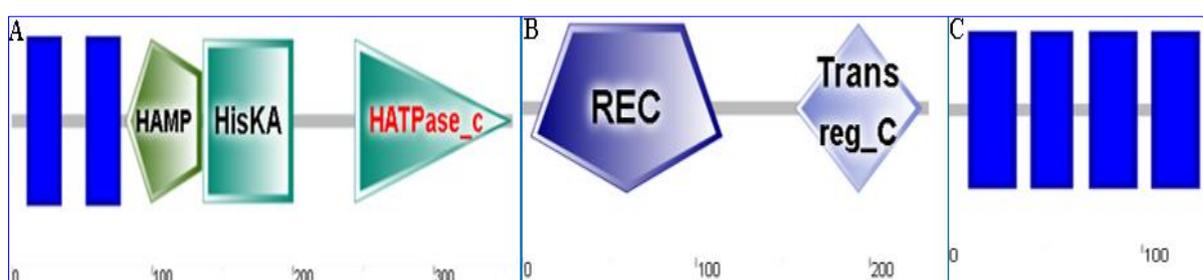
PSORT tool (<http://psort1.hgc.jp/form.html>), the CrrA protein was identified as a cytoplasmic protein with a site of action close to the internal membrane. CrrB protein was localized as transmembrane protein and CrrC as internal membrane protein. Finally, the TrSSP tool (<http://bioinfo.noble.org/TrSSP/>) was used to predict the transport function for CrrC, it did not identify any domain bound to carrier proteins in the CrrC amino acid sequence. Only the CrrB sensor was identified as carrier protein with possible substrates proteins, mRNA and ions (table 7).

TABLE 7: Analysis of the location, and transport functions and specific substrate of CrrA, CrrB and CrrC proteins.

Determinants of resistance	TrrS							PSORT
	AA	ÍONS	ELETRON	PROTEIN/ RNAm	SUGAR	Others	TRANSPORT	
CrrA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Cytoplasm
CrrB	NO	YES	NO	YES	NO	NO	YES	Internal / External / Periplasmic Membrane
CrrC	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Bacterial internal membrane

LEGEND: AA: AMINOACIDS

Figure 1 – Prediction of CrrB, CrrA and CrrC protein domain.



LEGEND: Blue rectangles represent the transmembrane domains of CrrB and CrrC proteins. HAMP: Histidine kinase, Adenylcyclase, Methyl group receptor, phosphatase, HisKA: histidine kinase domain, HATPase_C: phosphatase domain, REC: signal receptor domain, Trans reg_C: DNA binding domain.

MULTILOCUS SEQUENCE TYPING

C. freundii C156 was assigned to sequence type (ST) 117 by MLST *Citrobacter freundii*. Their allelic *loci* profile are presented in Table 8. ST117 was not previously documented in a *C. freundii* clinical isolate that has been cited in the literature.

Table 8: Allelic variants of C156 *Citrobacter freundii* gene loci used for MLST typing.

ALILEC PROFILE							
<i>AspC</i>	<i>clpX</i>	<i>fadD</i>	<i>mdh</i>	<i>arca</i>	<i>DnaG</i>	<i>lysP</i>	ST
26	53	20	15	5	6	58	117

DISCUSSION

The mechanisms of resistance to polymyxins described in members of Enterobacteriaceae are largely due to chromosomal mutations in two-component regulatory genes (TCS) (JAYOL et al., 2017). Recently, a plasmid-mediated mechanism has been described, *mcr-1*, has been described in *E. coli* specimens isolated from food, animals and humans in China (LIU et al., 2016).

These mechanisms are complex and still not fully understood. Recent research has explained several previously unknown mechanisms and pathways that contribute to polymyxin resistance in members of Enterobacteriaceae (JAYOL et al., 2016). Among these mechanisms, TCS CrrAB is related to a high level of resistance to colistin in *K. pneumoniae* isolates with MIC \geq 128 μ g/mL (WRIGHT et al, 2015, CHENG et al., 2016, JAYOL et al., 2017; CAIN et al., 2017).

The identification of CrrAB highlights the multifaceted nature of the cells responding to selective pressure imposed by antimicrobials (WRIGHT et al., 2015). CrrAB acts in the

response to the stress of the external bacterial membrane. Comparative analyzes of the CrrAB region demonstrate that it is present in some strains of *K. pneumoniae* and absent in others, although it is present in other species of *Klebsiella* and *Enterobacter*. However, Wright et al., 2015 report that this region is in a different genetic context when compared to the genomes of *Enterobacter* and *Klebsiella*.

It was observed that the crrAB operon presents in the same genetic context described by Wright et al. (2015). In *C. freundii* C156 this region presents adjacent to the ABC transport. The GC content of the crr gene region is approximately 42%, much lower when compared to the GC content of the *C. freundii* C156 chromosome which is 51.58%. This result is in line with those mentioned in the studies made with these genes (WRIGHT 2015, CHENG et al., 2016, JAYOL et al., 2017, CAIN et al., 2018).

Cheng et al. (2016) describes six novel mutations in the histidine kinase sensor (CrrB) gene in clinical isolates of *K. pneumoniae* showing colistin MICs greater than 500 µg/mL obtained in Taiwan (CHENG et al., 2016). This result of CIM differs from those found by Wright et al. (2015), where a MIC of 16 µg/mL was reported. However, an epidemiological study conducted by Jayol et al. (2017) reported MICs \geq 500 µg/mL.

In this study, the MIC of polymyxin B found was 128 µg/mL for *C. freundii* C156. A single amino acid exchange located in a highly conserved motif among orthologous genes present in *K. pneumoniae*, designated the dimerization interface of the HAMP domain of the histidine kinase sensor CrrB, was identified. This genetic event aligns with the results found by Cheng et al. (2016), in addition to other epidemiological studies evaluating clinical isolates of polymyxin-resistant *K. pneumoniae* and changes in CrrB (WRIGHT et al., 2015, JAYOL et al., 2017).

Cheng et al. (2016) suggested the mechanism of action of CrrAB. In that study, through analysis of RNASeq, it was seen that in strains of *K. pneumoniae* ST258 that had mutations in any of the domains of the *crrB* gene the level of expression of PmrA. Analysis of the lipid A profile demonstrated alteration by Lara4N radicals, suggesting that the LPS modification pathway was *arnT*. During the study, Cheng et al. (2016) reported that in *K. pneumoniae* strain with deletion of the *crrC* gene attenuated the resistance to colistin, indicating that this gene can act by modeling the expression of *arnT* and PmrC, by regulation of PmrA. CrrC protein is identified in the genomic annotation by RAST as a possible transporter.

However, the assay with the aid of the TSRR tool shows that for protein sequence there is no specific substrate related to CrrC protein. SMART analysis identifies the cellular location of this protein as coupled to the inner region of the bacterial cell membrane. These data are corroborated by the studies of CHENG et al. (2016) in a clinical isolate of *K. pneumoniae*.

In this study, a single exchange between an alanine and a threonine at position 91 (A91T) in the amino acid sequence of the CrrB protein was found, located at the interface of the HAMP domain, which is probably related to the resistance phenotype presented by the clinical isolate *C. freundii* C156. These findings alone do not demonstrate the alteration of the susceptibility profile of the C156 strain. However, they are consistent with previous studies conducted in isolates of *K. pneumoniae* (WRIGHT et al., 2015, CHENG et al., 2016, JAYOL et al., 2017). The interactions between *C. freundii* and healthy individuals are considered of nonpathogenic nature. *C. freundii* belongs to a small group of opportunistic pathogens that frequently found in the hospital environment are capable of causing a variety of infections in individuals with chronic diseases (Anderson et al., 2018).

Infections caused by *C. freundii* are usually polymicrobial (LIU et al., 2017). Most of the time this pathogen is found in association with pathogens of clinical interest such as *E. coli*, *K. pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. This fact may mask the main etiological agent of the current infection, leading clinicians to act on pathogens with greater prominence in the clinic and ignoring the presence of *C. freundii*.

The analyzes for resistance profile studies of the *C. freundii* clinical isolate demonstrated the emerging potential of this pathogen to cause outbreaks in the hospital environment. The presence of plasmids with IncHI2 in which Tn4401 bearing the *blaKPC* gene was identified and the fact that this pathogen was isolated in the same clinical sample that isolated a carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*, reinforces the theory of high potential to acquire and transfer genes of resistance to various classes of antimicrobials.

The frequency of hospital isolates of *C. freundii* MDR has increased considerably over the last 5 years (LESKI et al., 2016). Liu et al. (2017) reported a high prevalence of *C. freundii* of qnr and aac (6') - Ib-cr, 72% and 68.9% respectively. The analysis of the resistance profile presented by these isolate showed that *C. freundii* were resistant to at least three antibiotics. In this study it was also reported the genetic diversity of *C. freundii* through MLST analysis where new TS were found. These data corroborate with those presented in this study for the resistance profile and a new ST for the species *Citrobacter freundii*, ST117 is described here. Genomic studies that identify the profile of antimicrobial resistance are necessary and urgent for the implementation of policies for the control and dissemination of MDR pathogens in the hospital environment and as an auxiliary tool for the development of new drugs or improvement of clinical therapeutics.

THANKS

CAPES research agency, the Graduate Program in Tropical Medicine of the Federal University of Pernambuco (PPGMedTrop-UFPE) and the research group on Bacterial Resistance of the Department of Microbiology of the Aggeu Magalhaes Recife-PE Institute (IAM / Fiocruz-PE).

REFERENCE

BARON, S. et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **Int J Antimicrob Agents**. EUA, p. 1-9. Ago. 2016.

CAIN AK et al. Morphological, genomic and transcriptomic responses of *Klebsiella pneumoniae* to the last-line antibiotic colistin. **Scientific Reports**, EUA, p.1-11, 01 jun. 2018.

CANNATELLI, A. et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. **Antimicrob Agents Chemother**. EUA, p. 5521-5526. Nov. 2013.

CANNATELLI, A. et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. **Antimicrob Agents Chemother**. EUA, p. 5696-5703. Out. 2014.

EL-HALFAWY OM, VALVANO MA. Antimicrobial Heteroresistance: an Emerging Field in Need of Clarity. **Clin. Microbiol. Rev**. EUA, p. 191-220, Jan.2015.

CHENG Y-H et al. Amino Acid Substitutions of CrrB Responsible for Resistance to Colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. **Int J Antimicrob Agents**. EUA p. 3709-3716. Marc. 2016.

GALES, AC. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**. EUA. p. 354-360. Ago. 2012.

GIAMARELLOU, H. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. **Int J Antimicrob Agents**. EUA, p. 1-8. 25. Set. 2016.

GIANI, T. et al. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. **Euro Surveill**. Sweden, p. 16-30. Mar. 2013.

HASMAN, H. et al. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. **Euro Surveill.** Sweden, p. 1-5. Jan. 2015.

JAYOL A et al. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. **Antimicrob. Agents Chemother.** EUA, p. 2780-2784, May. 2015.

JAYOL A et al. High Level Resistance to Colistin Mediated by Various Mutations in the *CrrB* Gene Among *Klebsiella pneumoniae* Producing Carbapenemase. **Antimicrob Agents and Chemother.** EUA, p. e01423-17. Oct. 2017.

LIU, L et al. Genetic diversity, multidrug resistance and virulence of *Citrobacter freundii* from diarrheal patients and healthy individuals. **Front Cell Infect Microbiol**, Switzerland, p.01-10. Jul. 2018.

LIU, X et al. Complete Genome Sequence of Multidrug-Resistant *Citrobacter freundii* Strain P10159, Isolated from Urine Samples from a Patient with Esophageal Carcinoma. **Gen Announcements.** EUA, p. 1-2. Fev. 2016.

LIU, YY et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in Chi. **Lancet Infect Dis.** UK, p. 161-168. Fev. 2016.

MILLER, AK. et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. **Antimicrob Agents Chemother.** EUA, p. 5761-5769. Dez. 2011.

MOFFATT, JH. et al. Insertion sequence ISAbal1 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.** EUA, p. 3022-3024. Jun. 2011.

OLAITAN AO, MORAND S, ROLAIN J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Front Microbiol.** Switzerland, p. 1-18. Nov. 2014.

OLAITAN, AO. et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator *mgrB*: an epidemiological and molecular study. **Int J Antimicrob Agents.** EUA. p. 500-507. Dez. 2014.

OLAITAN, AO.; MORAND, S.; ROLAIN, Jn. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. **Int J Antimicrob Agents.** EUA. p. 1-3. Jan. 2016.

POIREL, L et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother.** UK. p. 75-80. Jan. 2015.

POIREL L., JAYOL A, NORDMANN P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clin Microbiol Rev.**, EUA, v. 2, n. 30, p.557-596, Abr. 2017.

POUDYAL A et al. In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother.** UK, p. 1311-1318. Dez. 2008.

SAMPAIO, JLM; GALES, AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Braz. J. Microbiol.** Brazil, p. 31-36. Dez. 2016.

SATO, Toyotaka et al. Pathogenic Lineage of mcr-Negative Colistin Resistant *Escherichia coli*, Japan, 2008–2015. **Emerg Infect Dis.** EUA, p.2223-2225. Dez. 2016. Carta ao editor.

WRIGHT MS et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** EUA, p. 536-543. Nov. 2015.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Parecer do comitê de ética de Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães – IAM/FIOCRUZ

Pesquisador responsável pelo projeto: Dr. Danilo Elias Xavier



Título do Projeto: "Acervo Microbiológico para Implantação de Programa de Vigilância e Estudo da Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos: Estudo genético dos Determinantes de Resistência Antimicrobiana entre Isolados Clínicos Bacterianos".

Pesquisador responsável: Danilo Elias Xavier

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 13/05/2015

Registro no CAAE: 45080915.0.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 1.190.837

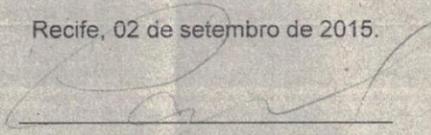
PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 02 de setembro de 2015.



Vice-Coordenador do CEP/CPqAM


 Paul Hindenburg Nebra de V. Silva
 Analista de Gestão em Saúde
 Vice-Coordenador
 Mat. SIAPE 1558906
 CEP/CPqAM/Fiocruz

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
 CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
 Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
 Recife - PE - Brasil
 comitedeetica@cpqam.fiocruz.br