

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

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

FLÁVIA ROBERTA BRUST

PORTO ALEGRE, 2017

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

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

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Porto Alegre, 2017

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

Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dr. Gertrudes Corção

Universidade Federal do Rio do Sul

Profa. Dr. Maria Helena da Silva Pitombeira Rigatto

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Brust, Flávia Roberta

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

116 f.

Orientador: Alexandre José Macedo.

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nelson Mandela

LISTA DE ABREVIATURAS

ANI: *Average Nucleotide Identify*

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CEC: complexo *Enterobacter cloacae*

c-di-GMP: monofosfato de guanosina dimérico cíclico

hsp60: *heat shock protein gene*

EPS: matriz exopolissacarídica

ERC: enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos

ESBLs: beta lactamases de espectro estendido

GGDC - *Genome-to-Genome Distance Calculator*

IABs: infecções associadas a biofilme

MIC: concentração inibitória mínima

NIH: *National Institute of Health*

NDM-1: New Delhi metallo- β -lactamase

PCR: *polymerase chain reaction*

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

the treatment was effective against larvae infected with 798-1S. We also observed discrepancies between *in vivo* and *in vitro* antimicrobial susceptibility. Polymyxin B did not enhance larvae survival despite susceptible profile *in vitro*. Triple combination presented synergistic effect *in vitro* against 798-1S and 798-4S but, this treatment was not able to enhance survival rates in larvae infected with 798-1S. On the other hand, monotherapy with meropenem was able to increase the survival of larvae infected with 798-4S besides *in vitro* resistance. Because fimbriae are involved in bacterial adhesion to biotic and abiotic surfaces and are also important for biofilm formation we decided to study the role of these virulence mechanisms in *E. hormaechei* subsp. *oharae* strains. According, hemagglutination results, the nine clinical isolates evaluated expressed type 1 fimbriae whereas only two isolates (798F e 977F) expressed type 3 fimbriae. Type 1 fimbriae mutant (997F Δ *fim*) and type 3 fimbriae mutant (798F Δ *mrk*) did not produce biofilm in 96 well polystyrene plate proving that these fimbriae are essential for biofilm formation. However, the mutant strains did not show differences on adhesion to bladder epithelial cells comparing with wild type strains. It is important to highlight that *E. hormaechei* subsp. *oharae* strains showed a high ability to adhere to these cells. Genome sequencing and plasmid profile of 7F, 798F and 997F isolates suggest that type 3 fimbriae operon *mrk*ABCDF is located on a plasmid. Taken together, these results indicate that (i) *E. hormaechei* subsp. *oharae* macrocolonies were able to generate subpopulations with distinct virulence and response to antimicrobial therapy characteristics; (ii) *in vitro* antimicrobial susceptibility testing methods showed limitations and may lead to therapeutic failure; (iii) type 1 and type 3 fimbriae are essential for biofilm formation in polystyrene plate; (iv) the ability to acquire plasmids encoding virulence and antimicrobial resistant genes confers benefits to *Enterobacter* genus and may explains its high prevalence in bacterial infection.

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

SUMÁRIO

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

LISTA DE FIGURAS

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

I - INTRODUÇÃO

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

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

Virulência é a habilidade do patógeno em causar doença e, fatores ou mecanismos de virulência são os determinantes responsáveis pelos danos ao hospedeiro (CLATWORTHY *et al.*, 2007; BECEIRO *et al.*, 2013). As adesinas fimbriais são fatores de virulência cruciais em bactérias gram negativas, pois são responsáveis pelo processo de adesão, uma etapa fundamental na patogênese

bacteriana que antecede a colonização e infecção. Estes apêndices extracelulares também estão envolvidos na invasão celular e na formação de biofilme (GIRARD e MOUREZ, 2006; ALLEN *et al.*, 2012).

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

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

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

II - REVISÃO DO TEMA

II - 1. Enterobacteriaceae

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

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

II - 2. Complexo *Enterobacter cloacae*

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

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

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

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

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

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

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

Tabela 1. Taxonomia do Complexo *Enterobacter cloacae*.

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

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

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

II - 2.1 *Enterobacter hormaechei*

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

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

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

II - 2.2 Epidemiologia

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

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

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

II - 3. Fatores de virulência

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

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

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

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

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

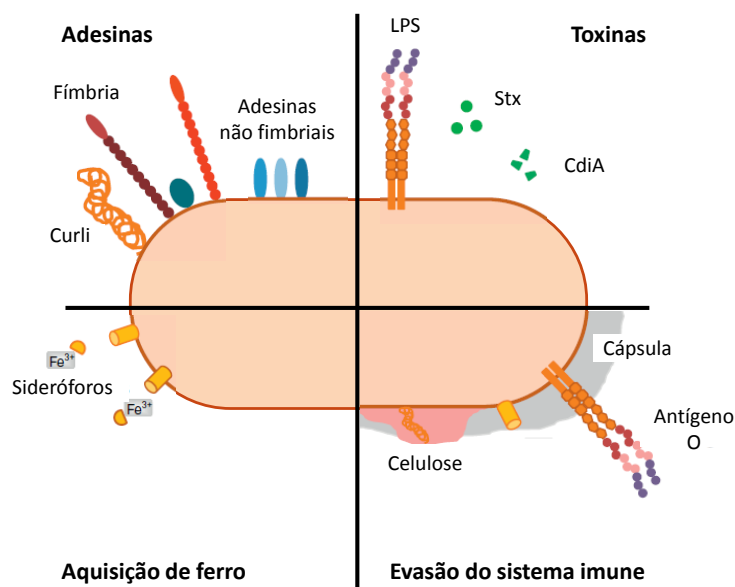


Figura 1. Alguns mecanismos de virulência encontrados na família Enterobacteriaceae. Adaptado de LUTHJE *et al.* (2014).

II - 3. 1 Biofilme

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

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

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

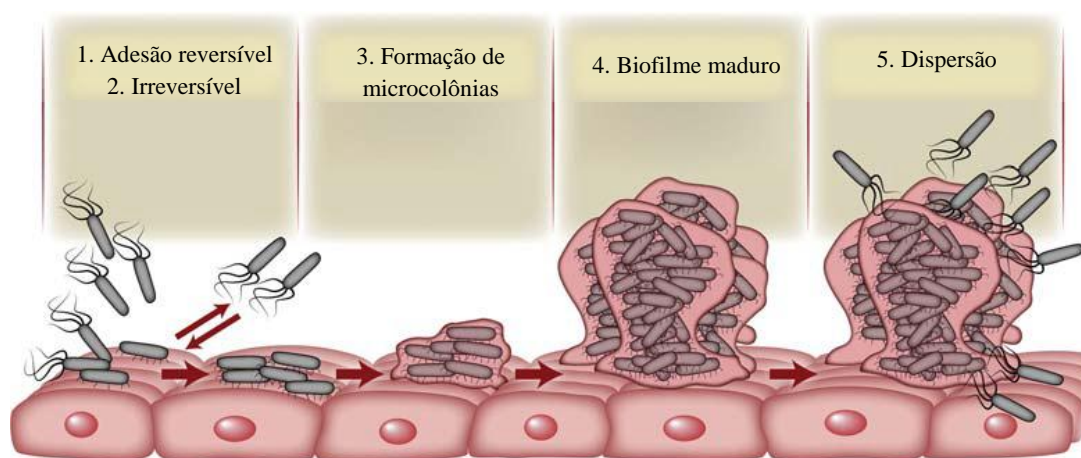


Figura 2. Etapas da formação de biofilme. Adaptado de KOSTAKIOTI *et al.* (2013).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Além disso, a expressão de curli, cuja função será discutida mais adiante, também é controlada pelo σ^S por meio da regulação do CsgD, ativador transcricional do operon *csgBAC* de curli (HENGGE, 2011).

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

II - 3.1.1 A problemática das infecções associadas a biofilme

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

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

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

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

II - 3.1.2. Modelos de biofilme - macrocolônias

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

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

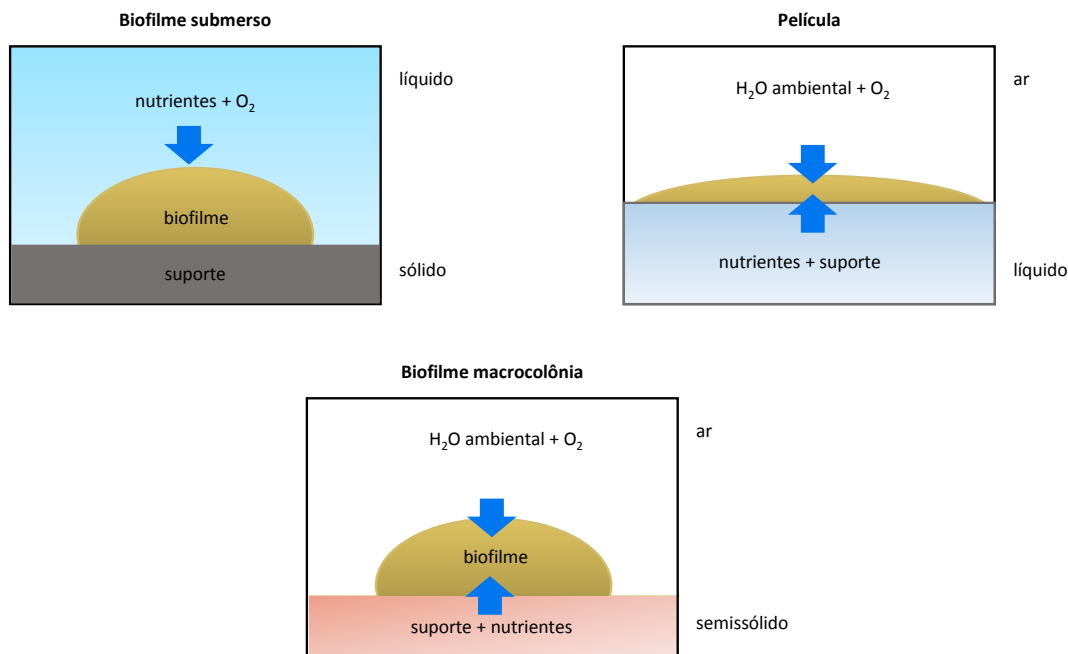


Figura 3. Modelos de biofilme. Representação esquemática de três tipos de biofilme encontrados na natureza, na indústria e na área médica. Adaptado de SERRA e HENGGE (2014).

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



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

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

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

II - 3. 2 Adesinas fimbriais

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

II - 3.2.1 Fímbrias do grupo *chaperone-usher*

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

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

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

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

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

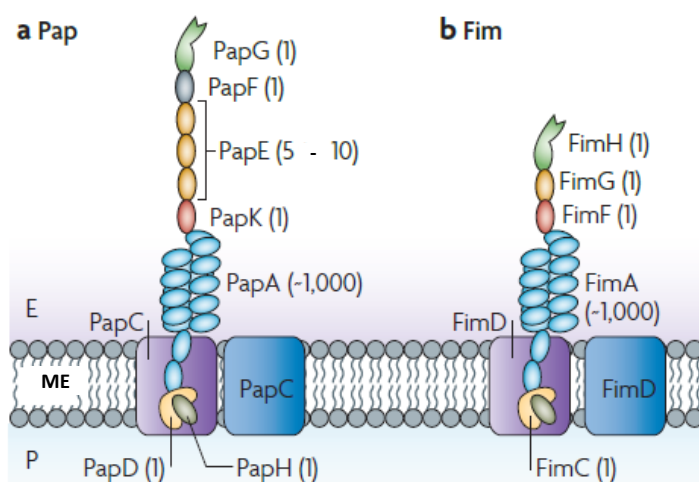


Figura 5. A) Estrutura de pili tipo P (*pap*) e B) fímbria tipo 1 (*fim*). As subunidades estão representadas por diferentes cores. Os números indicam o número de cópias de cada subunidade. As adesinas (verde) são responsáveis pela adesão às células do hospedeiro; proteínas *chaperones* (amarelo) estão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

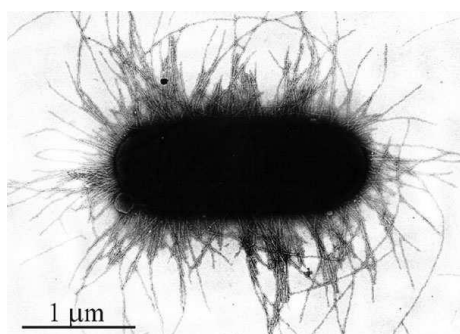


Figura 6. Micrografia eletrônica da fímbria tipo 1. A célula bacteriana possui de 100 a 500 fímbrias distribuídas na sua superfície, cada uma com 7 nm de largura e 0,2 a 2 μm de comprimento. Fonte: KLEMM e SCHEMBRI (2004).

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

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

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

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

II - 3.2.2 Curli

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

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

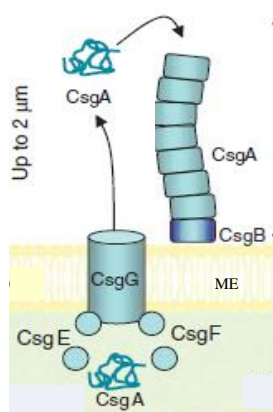


Figura 7. Estrutura da fímbria de curli. ME: membrana externa. Fonte: FRONZES *et al.* (2008).

II - 4. Resistência bacteriana

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Humanos e invertebrados possuem características evolutivas semelhantes o que possibilita o uso de invertebrados como modelo de hospedeiro para estudos *in vivo*. O emprego de *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella* confere diversas vantagens em relação aos modelos de mamíferos, razão pela qual seu uso vem aumentando. Dentre as vantagens podemos citar o baixo custo destes

invertebrados, a fácil manutenção, o tamanho reduzindo e o curto ciclo de vida que facilitam a utilização deles em experimentos laboratoriais (GLAVIS-BLOOM *et al.*, 2012).

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



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

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

componentes essenciais para o processo de infecção bacteriana como adesão celular, resistência a peptídeos antimicrobianos, degradação do tecido e adaptação ao estresse oxidativo parecem ser importantes tanto em insetos quanto em humanos (RAMARAO *et al.*, 2012).

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

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

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

III - OBJETIVOS

III - 1. Objetivo geral

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

III - 2. Objetivos específicos

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

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

IV - CAPÍTULO

IV - CAPÍTULO 1 - Macrocolony of NDM-1 Producing *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* Generates Subpopulations with Different Features Regarding the Response of Antimicrobial Agents and Biofilm Formation

Manuscrito publicado no periódico **Pathogens**. 2019 Apr 14;8(2). pii: E49.
doi:10.3390/pathogens8020049

Article

Macrocolony of NDM-1 Producing *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* Generates Subpopulations with Different Features Regarding the Response of Antimicrobial Agents and Biofilm Formation

Flávia Roberta Brust¹, Luana Boff¹, Danielle da Silva Trentin², Franciele Pedrotti Rozales³, Afonso Luís Barth³ and Alexandre José Macedo^{1,*}

¹ Faculty of Pharmacy and Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, CE 90610-000, Brazil; flaviabrust@gmail.com (F.R.B.); luana_boff@hotmail.com (L.B.)

² Basic Health Sciences Department, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, CE 90050-170, Brazil; danistrentin@gmail.com

³ Laboratory of Research in Bacterial Resistance, Center for Experimental Research, Clinical Hospital of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, CE 90035-007, Brazil; frozales@hotmail.com (F.P.R.); albarth@hcpa.edu.br (A.L.B.)

Correspondence: alexandre.macedo@ufrgs.br; Tel.: +55 51 33085354; Fax: +55 51 33086082

Received: 26 February 2019; Accepted: 11 April 2019; Published: date

Abstract: *Enterobacter cloacae* complex has been increasingly recognized as a nosocomial pathogen representing the third major Enterobacteriaceae species involved with infections. This study aims to evaluate virulence and antimicrobial susceptibility of subpopulations generated from macrocolonies of NDM-1 producing *Enterobacter hormaechei* clinical isolates. Biofilm was quantified using crystal violet method and fimbrial genes were investigated by PCR. Susceptibility of antimicrobials, alone and combined, was determined by minimum inhibitory concentration and checkerboard assays, respectively. Virulence and efficacy of antimicrobials were evaluated in *Galleria mellonella* larvae. Importantly, we verified that some subpopulations that originate from the same macrocolony present different biofilm production ability and distinct susceptibility to meropenem due to the loss of *bla*_{NDM-1} encoding plasmid. A more in-depth study was performed with the 798 macrocolony subpopulations. Type 3 fimbriae were straightly related with biofilm production; however, virulence in larvae was not statistically different among subpopulations. Triple combination with meropenem–rifampicin–polymyxin B showed in vitro synergistic effect against all subpopulations; while in vivo this treatment showed different efficacy rates for 798-1S and 798-4S subpopulations. The ability of multidrug resistant *E. hormaechei* isolates in generating bacterial subpopulations presenting different susceptible and virulence mechanisms are worrisome and may explain why these infections are hardly overcome.

Keywords: *Enterobacter*; macrocolony biofilm; *bla*_{NDM-1}; antimicrobial treatment; *Galleria mellonella*

1. Introduction

The Enterobacteriaceae family is composed by many bacteria, including *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Enterobacter* spp., responsible for community-associated as well as healthcare-associated infections [1–3]. In the last decades, species of the *Enterobacter cloacae* complex (ECC) have aroused

greater concern, since they are increasingly associated with carbapenemase-encoding genes acquisition, being the second or third most common carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) [4-7]. Carbapenem resistance constitutes a global public-healthcare problem associated with a high mortality and an increase of healthcare costs [8-10]. The New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1) is one of the most clinically significant carbapenemase, this enzyme has been rapidly spread through all continents [11] since its detection in 2008 in India [12].

Therapy options for CPE are extremely limited and the optimal treatment for these infections is controversial. Studies have reported that combination therapy with two or more antimicrobials is associated with a better outcome than monotherapy [13-15]. The synergistic interactions among antimicrobial agents minimize the use of extremely high doses and emergence of resistance, as well as potentiate the effectiveness of individual agents [16]. Frequently, carbapenem-containing combinations are used in addition to polymyxin in clinical settings. Studies suggest an additional benefit of including a carbapenem in combination regimens, especially in the context of strains with low minimum inhibitory concentrations (MICs) against carbapenems [15, 17]. Rifampicin is also considered for inclusion in combination regimens because of its ability to penetrate intracellular sites and biofilms, which could be important in the treatment of CPE infections involving biofilm [16]. Susceptibility to fluoroquinolones is rare among CPE, while susceptibility to sulfas and aminoglycosides may be unpredictable and can vary according to geographic location and strain type. Antimicrobials with reliable activity against CPE (> 85% of strains susceptible) typically include tigecycline, polymyxin B and colistin, and fosfomycin [17].

Most studies involving CPE evaluate treatment options against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections. Studies of antimicrobial agent combinations against NDM-1 strains remains small [17]. In order to evaluate the best therapeutic options for bacterial infections, the non-vertebrate *Galleria mellonella* has been increasingly used as experimental host since this model is inexpensive, there are no ethical constraints, and it represents an easy alternative to mammals to generate reliable and reproducible data about bacterial pathogenicity and antimicrobial treatment [18-19].

The taxonomy of ECC is confusing, and uncertainty still remains about what species belong to this complex [4]. ECC is composed by closed related species and subspecies; one of the most frequently species isolated in humans is *Enterobacter hormaechei* [4, 20-23]. *Enterobacter hormaechei* strains can persist and spread in nosocomial environments, and often exhibit resistance to multiple clinically important antimicrobial agents [24]. This species has been also related with hospital outbreaks [24-25]. Although *E. hormaechei* is an important emerging pathogen and a key member of the highly diverse ECC [26], little is known about their virulence-associated properties [23, 27]. Paauw et al. (2009) evaluated an *E. hormaechei* strain that caused an outbreak in Netherlands and found most isolates carried large conjugative plasmid containing genes encoding heavy-metal resistance, mobile elements, pili-associated proteins and exported proteins, as well as multiple-resistance genes [25].

Biofilm formation represents an important virulence mechanism produced by bacteria. The microbial multicellular relationship produces physical structures reflecting the complex interactions among their individual constituents. Various bacterial activities, including cell growth and cell death, nutrient acquisition, waste product accumulation, motility mechanisms, and exopolysaccharide synthesis can influence the biofilm architecture and functionality [28-29]. Like in biofilms, bacteria grown on agar surfaces represent heterogeneous and spatially structured populations, where some cells are actively growing, whereas others are in stationary or intermediate stages [30]. These characteristics make bacterial macrocolony a highly valuable model to study physiological differentiation and architectural development in biofilm [29]. Considering the importance of ECC in healthcare-associated infections and its ability to acquire antimicrobial-resistance genes, the aim of this study was to evaluate virulence and response to antimicrobial agents of subpopulations generate by macrocolony biofilm of NDM-1 producing *E. hormaechei* subsp. *oharae* clinical isolates.

2. Results

2.1. Bacterial Macrocolonies Generate Subpopulations with Distinct Susceptibility to Meropenem and Ability to Form Biofilm

After five days of incubation, *E. hormaechei* subsp. *oharae* macrocolonies generated distinguishable heterogeneous regions, termed subpopulations (Figure 1). These subpopulations were randomly selected according their morphologies and cells taken from them were used in the follow experiments. Subpopulations originated from the same macrocolony showed differences in meropenem susceptibility; some were susceptible (MIC < 2 µg/mL) and others resistant (MIC > 8 µg/mL). Presence of *bla*_{NDM-1} gene was evaluated in all subpopulations (data not shown) and it was not detected in susceptible subpopulations, confirming that the loss of this gene restored meropenem susceptibility. Susceptibility to ceftazidim, ciprofloxacin, gentamicin, and meropenem are summarized in Table 1. Subpopulations of all macrocolonies were resistant to ceftazidim (MIC > 4 ug/mL) and ciprofloxacin (MIC > 0.5 ug/mL) and only subpopulations originated of macrocolonies 7 and 997 were susceptible to gentamicin (MIC < 2 µg/mL), according the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [31]. MIC values of the antimicrobial agents cited above were similar among subpopulations of the same macrocolony.

Table 1. Minimum inhibitory concentration of antimicrobial agents against *E. hormaechei* subsp. *oharae* subpopulations.

Subpopulations	CAZ	CIP	GEN	MER
7-1S	>256	8	≤2	32
7-2 S	>256	8	≤2	64
7-3 S	32	8	≤2	≤2
7-4 S	>256	8	≤2	32
67-1 S	>256	>256	256	64
67-2 S	>256	>256	256	256
104-1 S	32	128	32	≤2
104-2 S	32	128	16	≤2
104-3 S	32	128	16	≤2
245-1 S	128	64	>256	≤2
245-2 S	64	64	>256	≤2
245-3 S	64	64	>256	≤2
798-1 S	>256	16	256	32
798-2 S	>256	32	>256	32
798-3 S	>256	32	256	16
798-4 S	>256	8	128	16
821-1 S	64	>256	>256	≤2
821-2 S	>256	256	>256	32
821-3 S	>256	128	32	64
821-4 S	>256	256	>256	32
977-1 S	256	8	256	≤2
977-2 S	>256	8	256	≤2
997-1 S	>256	8	≤2	≤2
997-2 S	>256	8	≤2	≤2
1105-1 S	>256	64	>256	32
1105-2 S	>256	64	256	64
1105-3 S	128	64	256	≤2

Highlighted rows presented macrocolonies that lost the *bla*_{NDM-1} gene and became susceptible to meropenem. CAZ: Ceftazidim, CIP: Ciprofloxacin, GEN: Gentamicin, MER: Meropenem. Minimum inhibitory concentrations are in µg/mL.

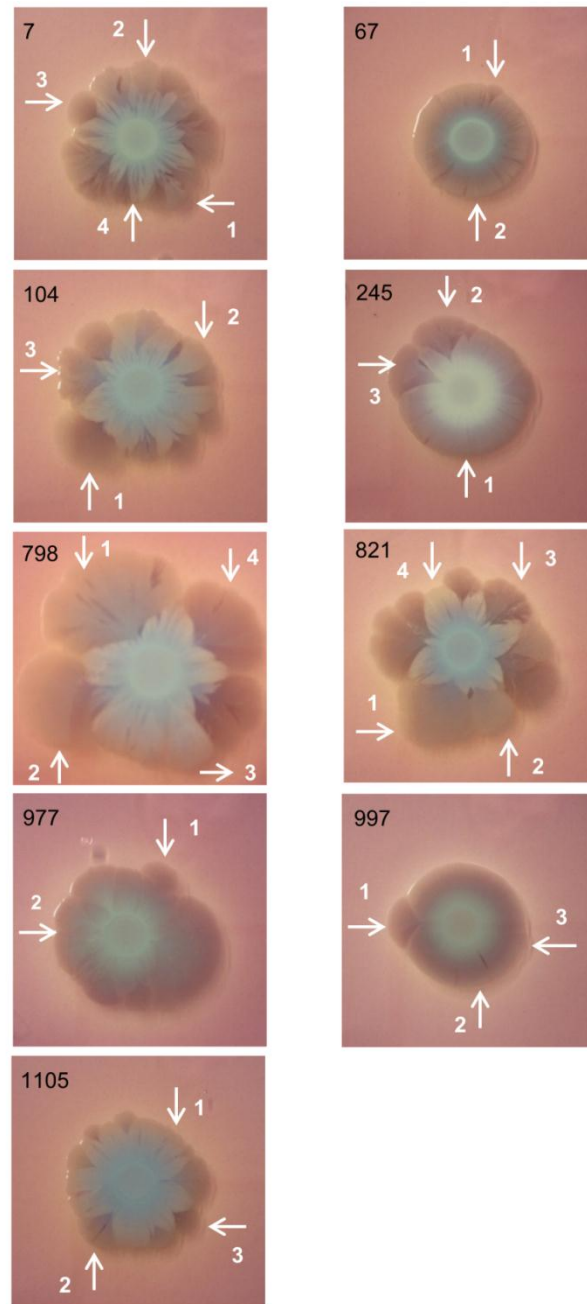


Figure 1. Macrocolonies of *E. hormaechei* subsp. *oharae* clinical isolates. Bacterial macrocolonies were grown in LB with Congo Red and Coomassie brilliant blue for 5 days at 37 °C. The white arrows and numbers indicated areas of macrocolonies, termed subpopulations, used for further experiments. These subpopulations were randomly selected according to their morphologies.

Results of crystal violet assays showed that subpopulations were not able to produce much biofilm; however, we could still observe statistically differences in the ability to form biofilm among subpopulations of five macrocolonies (67, 798, 821, 977, and 1105) (Figure 2). Considering that subpopulations of the group 798 showed a heterogeneous behavior in biofilm formation and 798-1S was the highest biofilm producer, this group (798-1S, 798-2S, 798-3S, and 798-4S) was selected for further experiments in this study.

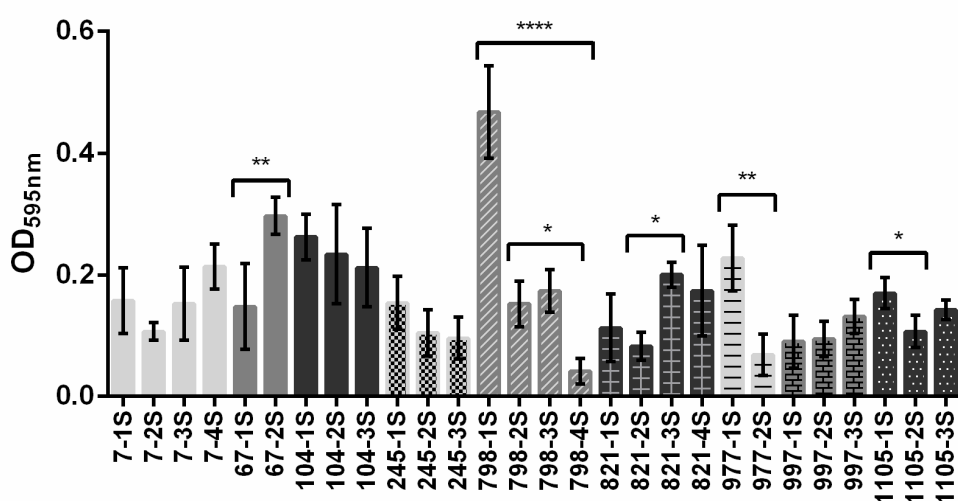


Figure 2. Biofilm formation of macrocolony subpopulations of *E. hormaechei* subsp. *oharae* clinical isolates. Bacteria were grown at 37 °C in microtiter plates containing Tryptone Soya Broth (TSB) for 24 h and then biofilm formation was quantified using crystal violet assay. The results are presented as the means and standard deviation. Significant differences in biofilm formation, among subpopulations of the same macrocolony, were pointed out when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.0001$ (****).

2.2. Subpopulations of 798 Macrocolony

2.2.1. Type 3 Fimbriae are Important for Biofilm Formation in *E. hormaechei* subsp. *oharae*

Biofilm formation was determined in different media: Luria Bertani broth (LB), LB with glucose (0.02 M), and M9 minimal medium supplemented with glucose (0.02 M) and $MgSO_4$ (0.002 M). The results showed that two (798-1S and 798-2S) of the four subpopulations were able to form biofilm (Figure 3A) and the amount of biofilm produced was higher in LB supplemented with glucose.

Since fimbriae play an important role in attachment and biofilm formation in gram-negative bacteria, we investigated the presence of fimbrial genes in order to understand the difference in biofilm formation ability among subpopulations. Genes encoding curli (*csgA*, *csgB*, and *csgD*), type 1 fimbriae (*fimA* and *fimH*), and P pili (*papC* and *papD*) were detected in all subpopulations. However, type 3 fimbriae encoding gene (*mrkB*) was detected only in two subpopulations (798-1S and 798-2S) (Figure 3B). Interestingly, only subpopulations with *mrkB* encoding gene were able to produce biofilm.

2.2.2. Checkerboard Assay: Triple Combination (meropenem–rifampicin–polymyxin B) is Effective against All Subpopulations

Synergism with double and triple antimicrobial combination against subpopulations generated from the 798 macrocolony was evaluated using checkerboard assay. At first, MIC of meropenem, rifampicin, and polymyxin B was determined. According to these results, all subpopulations showed a similar antimicrobial profile: susceptible to polymyxin B, resistant to meropenem, and with high MIC for rifampicin (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Table 2). In vitro combined inhibitory activities of meropenem–polymyxin B and rifampicin–meropenem achieved synergy against only one subpopulation (798-1S). Rifampicin–polymyxin B did not show synergistic activity against any subpopulation. On the other hand, triple combination with meropenem–rifampicin–polymyxin B presented synergistic effect against all subpopulations (Table 2).

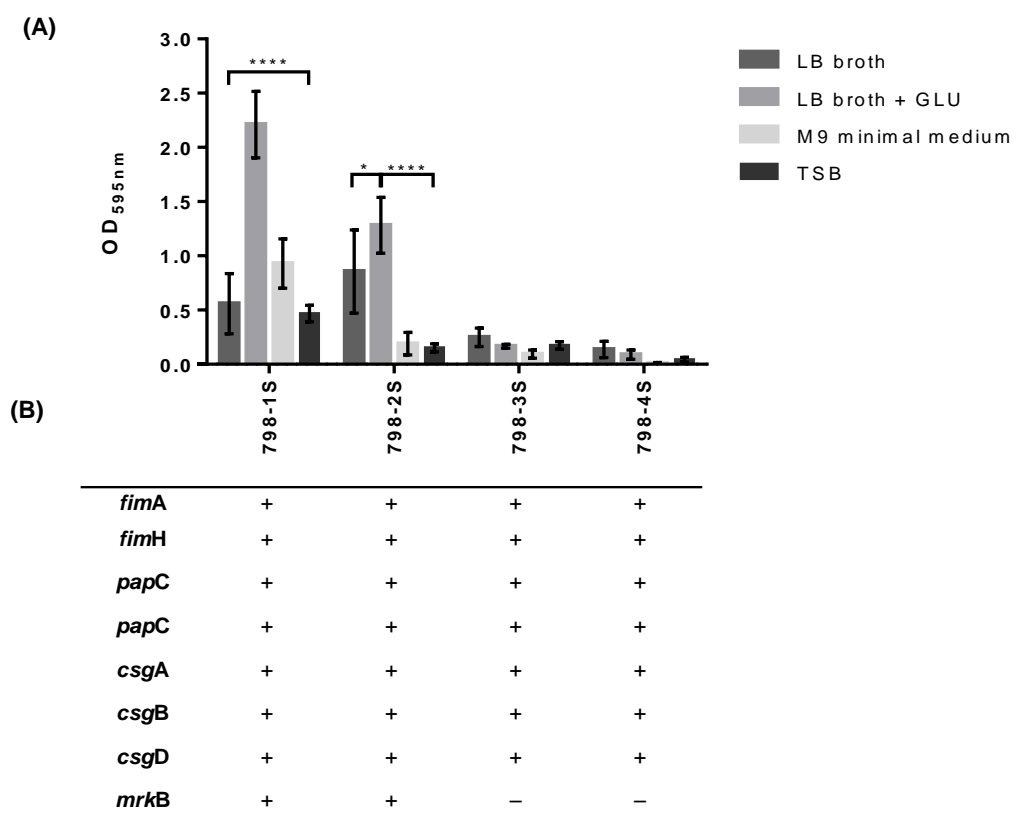


Figure 3. (A) Biofilm formation of *E. hormaechei* subsp. *oharae* 798 group. Bacteria were grown at 37 °C in microtiter plates containing LB broth, LB broth supplemented with glucose, M9 minimal medium or TSB for 24 h, after which biofilm formation was quantified. The results are presented as the means and standard deviation for three independent experiments. Significant differences in biofilm formation using LB broth + GLU were pointed out: $p < 0.05$ (*) and $p < 0.0001$ (****). (B) Fimbrial encoding genes: *fimA*, *fimH* (type 1 fimbriae genes), *papC*, *papD* (P pili genes), *csgA*, *csgB*, *csgD* (curli genes), and *mrkB* (type 3 fimbriae gene). Gene present: +; and gene absent: -.

Table 2. Minimum inhibitory concentration and checkerboard results of meropenem, polymyxin B, and rifampicin alone and combined against NDM-1 producing *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subpopulations.

Subpopulation	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			Checkerboard (interpretation)			
	MER	POL	RIF *	MER/POL	MER/RIF	POL/RIF	MER/POL/RIF
798-1S	32 (R)	2 (S)	128	4/0.5 (SE)	2/8 (SE)	1/64 (NI)	2/0.25/4 (SE)
798-2S	32 (R)	1 (S)	128	8/0.5 (NI)	0.5/64 (NI)	1/1 (NI)	1/0.25/4 (SE)
798-3S	16 (R)	1 (S)	128	4/0.5 (NI)	1/64 (NI)	0.5/64 (NI)	1/0.25/4 (SE)
798-4S	16 (R)	1 (S)	128	1/1 (NI)	2/64 (NI)	0.5/64 (NI)	1/0.25/4 (SE)

MER: Meropenem, POL: Polymyxin B, RIF: Rifampicin; R: Resistant; S: Susceptible; SE: Synergistic effect, NI: No interaction. Synergistic effects are highlighted in gray. *There is no breakpoint for rifampicin against Enterobacteriaceae according to EUCAST.

2.2.3. *Galleria mellonella* Infection Model: Differences in Response to Antimicrobial Treatment between 798-1S and 798-4S Subpopulations

In order to determine the *G. mellonella* susceptibility to *E. hormaechei* subsp. *oharae* infection, larvae were infected with four different bacterial inocula (5.0×10^5 , 2.0×10^6 , 5.0×10^6 and 1.0×10^7 CFU/larva) of subpopulations 798-1S, 798-2S, 798-3S, and 798-4S. It was verified that increasing doses of bacteria resulted in reduced larval survival in a dose-dependent manner during 120 h of incubation (Figure 4). No macroscopic changes or deaths were observed in the uninfected groups. Based on these data, 1.0×10^7 CFU/larva was selected as the optimal inoculum for the subsequent treatment experiments, because this inoculum promotes staggered killing of approximately 80% of larvae covering the whole experimental period (Figure 4D). All subpopulations were pathogenic to *G. mellonella*. Before treating infected larvae, we evaluated toxicity of meropenem, polymyxin B, and rifampicin and after five days of incubation, all larvae injected with these antimicrobial agents were alive (data not shown).

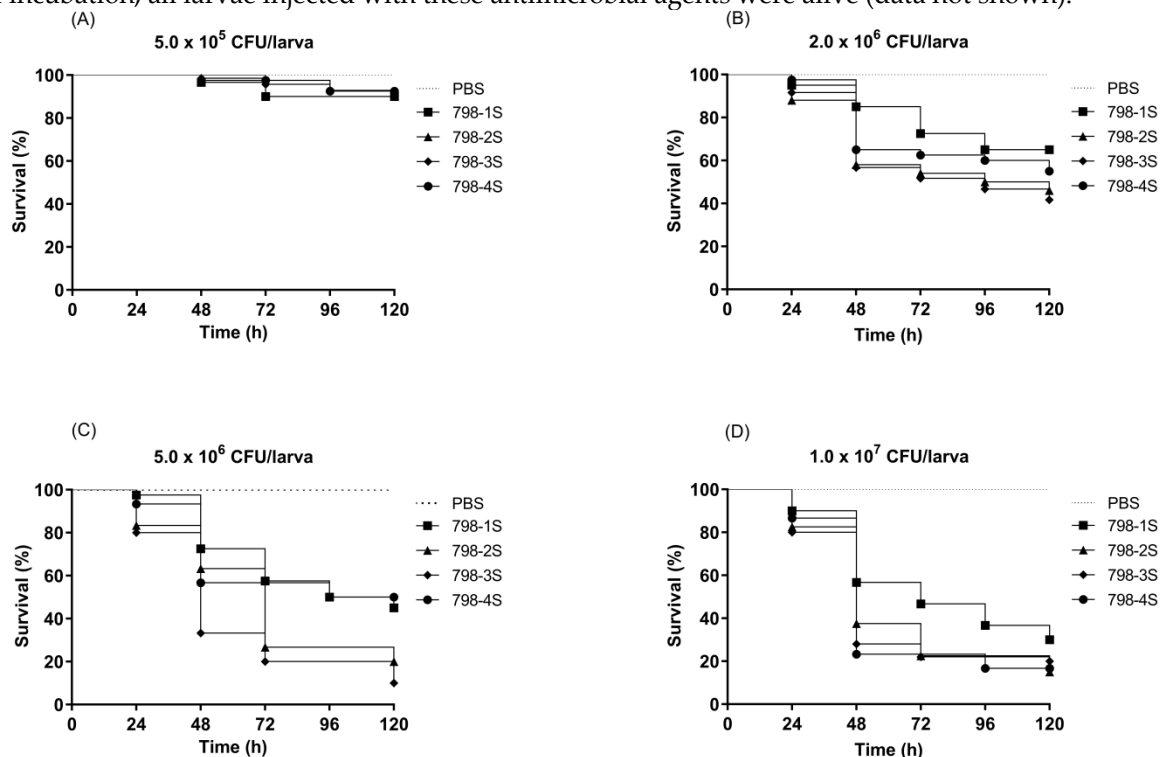


Figure 4. Survival curves of *G. mellonella* larvae inoculated with different inocula of *E. hormaechei* subsp. *oharae* (subpopulations 798-1S, 798-2S, 798-3S, and 798-4S): (A) 5.0×10^5 , (B) 2.0×10^6 , (C) 5.0×10^6 , and (D) 1.0×10^7 CFU/larva.

In vivo antimicrobial treatments were evaluated against 798-1S and 798-4S subpopulations. These subpopulations were chosen because they presented the most distinct virulence pattern in *G. mellonella*. The 798-1S showed a tendency to be less virulent (30% of survival after 120 h of incubation) and the 798-4S the more virulent (16.7% of survival) when larvae were inoculated with 1.0×10^7 CFU.

Efficacy of monotherapy and triple antimicrobial combination in larvae infected with NDM-1 producing *E. hormaechei* subsp. *oharae* are shown in Figure 5. Meropenem alone (Figure 5G) or combined with polymyxin B plus rifampicin (Figure 5H) showed a significantly protective effect against 798-4S ($p = 0.0010$ and $p < 0.0001$, respectively). Conversely, none of the tested treatments was able to enhance the larvae survival when they were infected with 798-1S (Figure 5A–D), although this subpopulation has killed fewer larvae than the 798-4S.

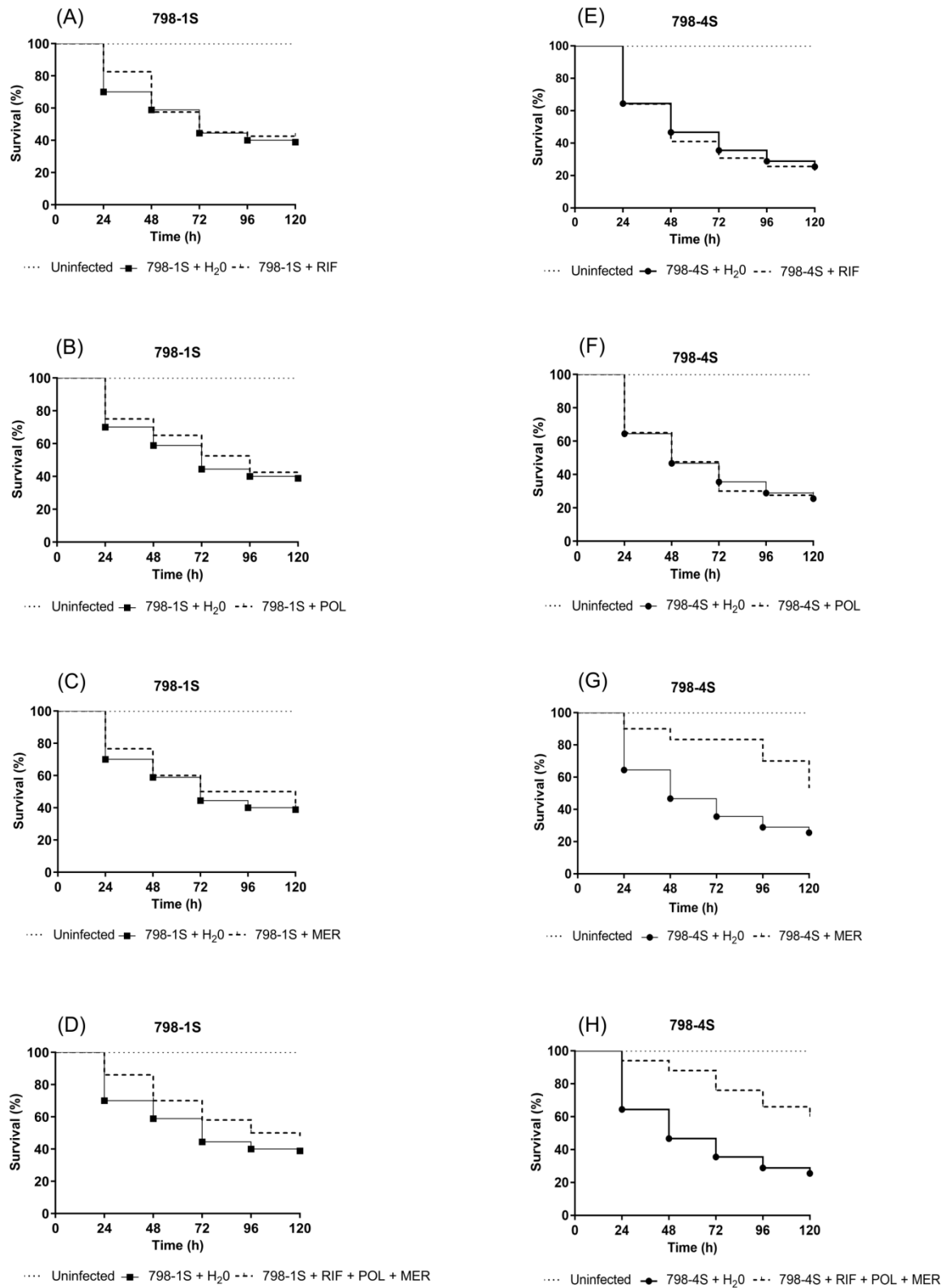


Figure 5. Survival curves for *G. mellonella* larvae inoculated with: (A–D) 798-1S and (E–H) 798-4S subpopulations following treatment with (A and E) RIF (20 mg/kg), (B and F) POL (3.0 mg/kg), (C and G) MER (85 mg/kg), or (D and H) RIF–POL–MER combination. H₂O: water; RIF: Rifampicin, POL: Polymyxin B, and MER: Meropenem.

3. Discussion

Enterobacter hormaechei subsp. *oharae* biofilm macrocolonies were able to generate genetically and phenotypically distinct subpopulations (Figure 1) that presented differences in virulence mechanisms and antimicrobial response.

The amount of biofilm produced by subpopulations generated from the same macrocolony was different in five of the nine clinical isolates (Figure 2). Interestingly, the strongest biofilm producer isolate was obtained from urine (798). It is possible that this strain has additional virulence mechanisms that allow bacteria to adhere to bladder cells and cause urinary tract infection. Important virulence factors that contribute to biofilm formation are extracellular appendages called fimbriae. Genes encoding curli, type 1 fimbriae, and P pili were detected in all subpopulations of the group 798; however, the type 3 fimbriae gene was only detected in subpopulations able to produce biofilm (798-1S and 798-2S). On the other hand, subpopulations without *mrkB* (798-3S and 798-4S) did not produce biofilm in vitro using four different mediums (Figure 3A). As far as we know, there is no data showing the role of type 3 fimbriae in biofilm formation of *Enterobacter* spp.

Type 3 fimbriae are encoded by the *mrkABCDF* gene cluster [32] and were initially identified in *Klebsiella pneumoniae* strains by Duguid [33]. Since then, type 3 fimbriae have been described in other members of the Enterobacteriaceae family, including *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., and *Escherichia coli* isolates [34-36]. In *K. pneumoniae*, this gene cluster is chromosomally encoded [37], while in other species it is found to be encoded by conjugative plasmids [36, 38]. Type 3 fimbriae are involved in attachment to abiotic and biotic surfaces and in biofilm formation [39-40]. There is little information about type 3 fimbriae related with *Enterobacter* spp. in the literature. Adegbola and Old investigated type 1 and type 3 fimbriae in *Enterobacter* spp. and showed that type 1 fimbriae is most frequent and that most strains produced only one of these fimbriae [34]. Similar findings were described by Hornick et al., where most of *E. cloacae* respiratory isolates produced type 1 fimbriae, and fewer numbers also expressed type 3 fimbriae [35]. Recently, Azevedo et al. investigated nine virulence genes, including *mrkD* (adhesin type 3 fimbriae) and *fimH* (adhesive subunit of type 1 fimbriae), in eight *E. cloacae* isolates; surprisingly, no isolates presented virulence genes [41].

Macrocolony is well described and accepted as a biofilm model. Usually, studies evaluate macrocolonies' structure and morphology, like the presence of wrinkle and ring patterns that are related with cellulose and curli fimbriae production, respectively [28-29, 42-46]. As far as we know, Richer et al. (2014) were the first to investigate different subpopulations/regions generated by macrocolony [47]. In a macrocolony biofilm, bacteria typically conjugate with their closest neighbors when physical contact occurs between a donor and recipient cell to transmit horizontal plasmid, creating subpopulations that are independent from each other [30]. In this sense, some studies observed that a plasmid-bearing population can originate clonal sectors of plasmid-free cells [48-49]. This can explain why plasmid encoding *bla_{NDM-1}* did not spread throughout all the macrocolony and some subpopulations restored meropenem susceptibility. We could also hypothesize that the same occurred with type 3 fimbriae, since these fimbriae are encoded by plasmids in most Enterobacteriaceae species.

Capability of bacteria to form biofilm on medical devices, such as catheter and prosthesis, has been proposed as one of the important mechanisms in nosocomially acquired and persistent infections, increasing resistance to antimicrobial treatment [16]. There are few studies evaluating biofilm formation in multidrug resistant strains. Recently, a study from Brazil demonstrated that the majority of repeated KPC infections are caused by the same strain that caused the previous infection/colonization, these findings illustrate the capacity of multiple clones producing biofilm to coexist in the same patient at the same time, serving as a constant reservoir of KPC in the hospital environment [50].

Regarding susceptibility profile, as expected, most subpopulations presented high antimicrobial resistance (Table 1). In vitro triple combination with meropenem–rifampicin–polymyxin B presented a

synergistic effect against all tested subpopulations (Table 2). Corroborating with our findings, Tangden et al. tested 14 antimicrobial combinations using time-kill experiments against two NDM-1-producing *K. pneumoniae* strains, and found that the combination of rifampicin–meropenem–colistin was the most effective regimen [51]. In another study, Urban et al. showed that combination of polymyxin B–doripenem–rifampicin achieved 100% bactericidal activity for *Pseudomonas aeruginosa* and *E. coli*, 80% for *K. pneumoniae*, and 60% for *Acinetobacter baumannii* despite resistance to the carbapenems and rifampicin alone [52]. Although rifampicin by itself is not considered for the treatment infections caused by gram-negatives due to the rapid emergence of resistance, in vitro studies suggest that rifampicin has a synergistic activity when used as part of a combination therapy regimen against CPE [51-55].

In vivo, meropenem alone or combined with polymyxin B and rifampicin showed a significantly protective effect in larvae infected with 798-4S ($p = 0.0010$ and $p < 0.0001$, respectively). Conversely, none of the tested treatments was able to enhance the larvae survival when they were infected with 798-1S (Figure 5), although this subpopulation has shown a tendency to be less virulent than the 798-4S. Our hypothesis is that other bacterial factors, than biofilm, are being expressed in vivo and that the larval immune system can respond differently according to distinct antigenic stimuli evoked by bacterial subpopulations, influencing host survival.

Taken together, some discrepancies between in vitro and in vivo results were observed: (i) Polymyxin B was effective in vitro but not in vivo against 798-1S and 798-4S; (ii) triple combination presented synergistic effect in vitro but did not show significant enhancement in survival rates of larvae infected with 798-1S; and (iii) monotherapy with meropenem was able to increase the survival of larvae infected with 798-4S when compared with the control group treatment with water (53.3% × 25.6% survival), while in vitro evaluation classified 798-4S as resistant to this antimicrobial.

Supporting these results, discrepancies between in vitro and in vivo susceptibility for polymyxin B have been published in literature [56-57]. Yang et al., reported contradictory results considering in vitro and in vivo (*G. mellonella* model) colistin (polymyxin E) susceptibility in *A. baumannii* strains [56]. Moreover, Benthall et al. showed that the treatment with colistina in *G. mellonella* presented variable activity against *K. pneumoniae*, regardless of intrinsic susceptibility. In this same study, the carbapenems appeared to act better in vivo than in vitro, with meropenem able to clear infections caused by strains possessing *bla*_{NDM-1} and *bla*_{VIM} carbapenemases [58], similarly as observed herein for subpopulation 798-4S.

In summary, our findings demonstrate discrepancies between in vitro and in vivo susceptibility of *E. hormaechei* subsp. *oharae* subpopulations to antimicrobial agents; some treatments were effective in vitro but not in vivo and vice versa. Interestingly, these subpopulations also showed different response to antimicrobial agents in *G. mellonella* infection model. Additionally, we may hypothesize that type 3 fimbriae are encoded on the plasmid and have a very important role in biofilm formation of *E. hormaechei* subsp. *oharae*. As far as we know, this is the first study evaluating macrocolonies of *E. cloacae* complex strains highlighting the potential of the macrocolony model as a tool to study the physiological heterogeneity within the biofilm.

The results point out the ability of a multidrug resistant *E. hormaechei* subsp. *oharae* isolate in generating subpopulations, with distinct phenotypic and genetic features related to biofilm formation and antimicrobial profile. These findings might be associated to long term and chronic infections leading to an additional challenge in the treatment of bacterial infections and highlight the urgent need for newer antimicrobial development against biofilm related infection.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Strains and Growth of Macrocolonies

Nine *E. hormaechei* subsp. *oharae* clinical isolates (Table 3) harboring *bla*_{NDM-1} gene (New Delhi metallo-beta-lactamase) were recovered from three hospitals and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ at the Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana of Hospital de Clínicas de Porto Alegre in Rio Grande do Sul, the southernmost state of Brazil. These isolates were previously evaluated by Rozales *et al.* [59].

At first, clinical isolates were streaked on LB agar and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight. After checking purity of cultures, one colony was selected and dissolved in 5 mL of LB broth and incubated at same conditions. For macrocolonies' growth, a volume of 3 μL of these cultures was spotted on LB agar plates supplemented with Congo Red (40 mg/L) and Coomassie Brilliant Blue (20 mg/L). The plates were incubated at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 days [42, 47].

After incubation, macrocolonies presented different areas, termed subpopulations. Cells were directly taken from these subpopulations and frozen in 10% skim milk with glycerol for further experiments. Before each experiment, these subpopulations were streaked on LB agar and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight.

Table 3. Bacterial strains used in this study.

<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i> Strains	Description
1 (245)	Sink isolate
2 (7)	Rectal swab isolate
3 (67)	Rectal swab isolate
4 (104)	Rectal swab isolate
5 (798)	Urine isolate
6 (821)	Cerebrospinal fluid isolate
9 (977)	Rectal swab isolate
10 (997)	Rectal swab isolate
11 (1105)	Rectal swab isolate

In bold: Strains identification according to Rozales *et al.* (2014).

4.2. Biofilm Formation: Microtiter Plates Assay

Biofilm formation was quantified using crystal violet (CV) assay in 96-well microtiter plates [60]. After 24 h of incubation, plates were washed to remove unbound bacteria and the attached bacteria were heat-fixed at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h. The biofilm was then stained with crystal violet, quantified by dissolving CV in 96% ethanol, and the optical density was measured at 595 nm (OD₅₉₅). Biofilm formation was tested using different media: TSB, LB, LB supplemented with glucose (0.02 M), and M9 minimal medium supplemented with glucose (0.02 M) and MgSO_4 (0.002 M).

4.3. Polymerase Chain Reaction (PCR): Fimbrial Genes Detection

DNA of bacterial cells was extracted using boiling method, which is based on thermal shock and lysis of components other than nucleic acids. The same PCR cycling conditions used were for all genes: initial denaturation at 95 °C for 5 min followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 58 °C for 30 s, extension at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 5 min. Primer sets were design for PCR detection of fimbrial genes (Table 4).

Table 4. Primers used in this study.

Gene	Encoding Protein	Primer Sequence (5' to 3')	Size (bp)
<i>csgA</i>	Major fimbrial subunit	Forward: caacctgatgcacagtcacc Reverse: tggacagggatctgatgaca	214
<i>csgB</i>	Minor subunit	Forward: agccatttgcgactgtctct Reverse: tgtccgttattcccaggag	233
<i>csgD</i>	Transcriptional regulator of the <i>csgBAC</i> operon	Forward: ccttcctacaagcgacagc Reverse: tcgcgaaaggatactcatc	236
<i>fimA</i>	Major fimbrial subunit	Forward: tgctgtcgaggatctcaatg Reverse: acggttaatctcgccagta	229
<i>fimH</i>	Fimbrial adhesion	Forward: ccccgctccagatagtcgtta Reverse: acgacctgacggacaaattc	210
<i>papC</i>	Fimbrial usher	Forward: ccctgaagaccgatgacaat Reverse: cggaacggaggtttgataga	148
<i>papD</i>	Fimbrial chaperone	Forward: tggatggaagacgagaaagg Reverse: catccagtacagcgtctcg	134
<i>mrkB</i>	Fimbrial chaperone	Forward: ggtggctgaatctgctggaaatt Reverse: atcacggtttactgttcagggttt Reverse: attggcataagtgcgaatcc	514

csgA, *csgB*, and *csgD*: Curli genes; *fimA* and *fimH*: Type 1 fimbriae genes; *papC* and *papD*: P pili genes; *mrkB*: Type 3 fimbriae gene.

4.4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC): Agar Dilution Method

MIC of antimicrobial agents ceftazidim, ciprofloxacin, gentamicin, and meropenem was determined for all subpopulations using the agar dilution method according to EUCAST guideline [31]. The MIC was defined as the lowest concentration of the drug that inhibited growth of the tested bacteria. All MIC experiments were performed at least three times.

4.5. Checkerboard Assay

Minimum inhibitory concentration of meropenem, rifampicin, and polymyxin B and synergy with double and triple combinations were performed using the checkerboard method in 96-well microtiter plates with Mueller–Hinton broth and bacterial suspension containing approximately 5×10^5 CFU/mL [61]. MIC and synergistic effect were visually determined as the lowest drug concentration (alone or combined, respectively) that inhibited bacterial growth. Susceptibility of meropenem and polymyxin B was interpreted according to EUCAST [31]. There is no standardized breakpoint value for rifampicin against Enterobacteriaceae according to guidelines. The synergism was determined by the fractional inhibitory concentration index (FICI) and interpreted as follows: $FICI \leq 0.5$ indicates synergy; $FICI > 0.5 \leq 4$ = no interaction; $FICI > 4.0$ = antagonism [61-62].

4.6. *Galleria mellonella* Model Studies

The whole cycle of *G. mellonella* was maintained in our laboratory at 28 °C. Insects were fed with an artificial diet consisting of honey and several flours. Larvae weighting 220–260 mg were randomly selected to comprise groups of ten larvae which were inoculated with 10 uL of bacterial suspension by injection into the haemocoel via the last right proleg, using a Hamilton syringe (Sigma-Aldrich). Four different bacterial suspensions in sterile phosphate-buffered saline (PBS) were tested for each subpopulation: 5.0×10^5 , 2.0×10^6 , 5.0×10^6 and 1.0×10^7 CFU/larva. Uninfected larvae (either uninoculated or injected with only PBS) were used as negative controls. Afterwards caterpillars were incubated in Petri dishes at 37 °C and were observed daily during 120 h. They were considered dead when they did not respond to touch.

Based on larvae survival curve with different inocula, bacterial concentration of 1.0×10^7 CFU/larva was selected to be used for evaluating treatment efficacy. Antimicrobial agents (10 uL) were administered as single injection into the last left proleg 30 min after bacterial inoculation. Antimicrobial doses were selected to be representative of those used to treat human infection: polymyxin B at 3.0 mg/kg, meropenem at 85 mg/kg, and rifampicin at 20 mg/kg [13].

4.7. Statistical Analysis

Larvae survival data were plotted using the Kaplan–Meier curve and comparisons between groups were made using the log-rank test (Graphpad Prism 6 software). Biofilm formation of subpopulations generated from the same macrocolony was compared using two-way ANOVA. All analyses were performed on at least three independent experiments using Graphpad Prism 6 software. In all tests, $p \leq 0.05$ was considered significant.

Author Contributions: Design: F.R.B. and A.J.M.; supervision: A.J.M.; funding acquisition: A.J.M and A.L.B.; clinical isolates: A.L.B. and F.P.R.; methodology experiments: F.R.B. and L.B.; *Galleria mellonella* larvae: D.S.T.; writing—original draft preparation: F.R.B.; writing—review and editing: A.J.M., A.L.B., and D.S.T.

Funding: This research was funded by FAPERGS (1871-25511/13-4), MCTI/CNPq (408578/2013-0), Universal/CNPq (443150/2014-1), INCT – INPRA (465718/2014-0). FRB received a doctoral fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Acknowledgments: The authors thank Karen Angeliki Krogfelt for reviewing the manuscript and Viviane Nunes da Silva Anselmo for technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Peleg, A. Y.; Hooper, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med* **2010**, *362* (19), 1804-13. doi: 10.1056/NEJMra0904124.
2. Morgan, D. J.; Lomotan, L. L.; Agnes, K.; McGrail, L.; Roghmann, M. C. Characteristics of healthcare-associated infections contributing to unexpected in-hospital deaths. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2010**, *31* (8), 864-6. doi: 10.1086/655018.
3. van Duin, D.; Paterson, D. L. Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infect Dis Clin North Am* **2016**, *30* (2), 377-390. doi: 10.1016/j.idc.2016.02.004.
4. Chavda, K. D.; Chen, L.; Fouts, D. E.; Sutton, G.; Brinkac, L.; Jenkins, S. G.; Bonomo, R. A.; Adams, M. D.; Kreiswirth, B. N. Comprehensive Genome Analysis of Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp.: New Insights into Phylogeny, Population Structure, and Resistance Mechanisms. *MBio* **2016**, *7* (6). doi: 10.1128/mBio.02093-16.

5. Moradigaravand, D.; Reuter, S.; Martin, V.; Peacock, S. J.; Parkhill, J. The dissemination of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* throughout the UK and Ireland. *Nat Microbiol* **2016**, *1*, 16173. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.173.
6. Lazarovitch, T.; Amity, K.; Coyle, J. R.; Ackerman, B.; Tal-Jasper, R.; Ofer-Friedman, H.; Hayakawa, K.; Bogan, C.; Lephart, P. R.; Kaplansky, T.; Maskit, M.; Azouri, T.; Zaidenstein, R.; Perez, F.; Bonomo, R. A.; Kaye, K. S.; Marchaim, D. The Complex Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacter Infections: A Multicenter Descriptive Analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2015**, *36* (11), 1283-91. doi: 10.1017/ice.2015.186.
7. Jean, S. S.; Hsueh, P. R.; Group, S. A.-P. Distribution of ESBLs, AmpC beta-lactamases and carbapenemases among Enterobacteriaceae isolates causing intra-abdominal and urinary tract infections in the Asia-Pacific region during 2008-14: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *J Antimicrob Chemother* **2017**, *72* (1), 166-171. doi: 10.1093/jac/dkw398.
8. Kontopidou, F.; Giamarellou, H.; Katerelos, P.; Maragos, A.; Kioumis, I.; Trika-Graphakos, E.; Valakis, C.; Maltezou, H. C.; Group for the Study of, K. P. C. p. K. p. i. i. i. c. u. Infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among patients in intensive care units in Greece: a multi-centre study on clinical outcome and therapeutic options. *Clin Microbiol Infect* **2014**, *20* (2), O117-23. doi: 10.1111/1469-0691.12341.
9. Bartsch, S. M.; McKinnell, J. A.; Mueller, L. E.; Miller, L. G.; Gohil, S. K.; Huang, S. S.; Lee, B. Y. Potential economic burden of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in the United States. *Clin Microbiol Infect* **2017**, *23* (1), 48 e9-48 e16. doi: 10.1016/j.cmi.2016.09.003.
10. Thabit, A. K.; Crandon, J. L.; Nicolau, D. P. Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials. *Expert Opin Pharmacother* **2015**, *16* (2), 159-77. doi: 10.1517/14656566.2015.993381.
11. Dortet, L.; Poirel, L.; Nordmann, P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int* **2014**, *2014*, 249856. doi: 10.1155/2014/249856.
12. Yong, D.; Toleman, M. A.; Giske, C. G.; Cho, H. S.; Sundman, K.; Lee, K.; Walsh, T. R. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, *53* (12), 5046-54. doi: 10.1128/AAC.00774-09.
13. Morrill, H. J.; Pogue, J. M.; Kaye, K. S.; LaPlante, K. L. Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. *Open Forum Infect Dis* **2015**, *2* (2), ofv050. doi: 10.1093/ofid/ofv050.
14. Falagas, M. E.; Lourida, P.; Poulidakos, P.; Rafailidis, P. I.; Tansarli, G. S. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**, *58* (2), 654-63. doi: 10.1128/AAC.01222-13.
15. Trecarichi, E. M.; Tumbarello, M. Therapeutic options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Virulence* **2017**, *8* (4), 470-484. doi: 10.1080/21505594.2017.1292196.
16. Chung, P. Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* **2016**, *363* (20). doi: 10.1093/femsle/fnw219.
17. Perez, F.; El Chakhtoura, N. G.; Papp-Wallace, K. M.; Wilson, B. M.; Bonomo, R. A. Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: can we apply

"precision medicine" to antimicrobial chemotherapy? *Expert Opin Pharmacother* **2016**, *17* (6), 761-81. doi: 10.1517/14656566.2016.1145658.

18. Desbois, A. P.; Coote, P. J. Utility of Greater Wax Moth Larva (*Galleria mellonella*) for Evaluating the Toxicity and Efficacy of New Antimicrobial Agents. *Adv Appl Microbiol* **2012**, *78*, 25-53. doi: 10.1016/B978-0-12-394805-2.00002-6.

19. Gruber, T. M.; Gottig, S.; Mark, L.; Christ, S.; Kempf, V. A.; Wichelhaus, T. A.; Hamprecht, A. Pathogenicity of pan-drug-resistant *Serratia marcescens* harbouring *bla*NDM-1. *J Antimicrob Chemother* **2015**, *70* (4), 1026-30. doi: 10.1093/jac/dku482.

20. Hoffmann, H.; Roggenkamp, A. Population genetics of the nomenclotype *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol* **2003**, *69* (9), 5306-18. doi: 10.1128/AEM.69.9.5306-5318.2003.

21. Ohad, S.; Block, C.; Kravitz, V.; Farber, A.; Pilo, S.; Breuer, R.; Rorman, E. Rapid identification of *Enterobacter hormaechei* and *Enterobacter cloacae* genetic cluster III. *J Appl Microbiol* **2014**, *116* (5), 1315-21. doi: 10.1111/jam.12439.

22. Morand, P. C.; Billoet, A.; Rottman, M.; Sivadon-Tardy, V.; Eyrolle, L.; Jeanne, L.; Tazi, A.; Anract, P.; Courpied, J. P.; Poyart, C.; Dumaine, V. Specific distribution within the *Enterobacter cloacae* complex of strains isolated from infected orthopedic implants. *J Clin Microbiol* **2009**, *47* (8), 2489-95. doi: 10.1128/JCM.00290-09.

23. Davin-Regli, A.; Pages, J. M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol* **2015**, *6*, 392. doi: 10.3389/fmicb.2015.00392.

24. Beyrouthy, R.; Baretts, M.; Marion, E.; Dananche, C.; Dauwalder, O.; Robin, F.; Gauthier, L.; Jousset, A.; Dortet, L.; Guerin, F.; Benet, T.; Cassier, P.; Vanhems, P.; Bonnet, R. Novel *Enterobacter* Lineage as Leading Cause of Nosocomial Outbreak Involving Carbapenemase-Producing Strains. *Emerg Infect Dis* **2018**, *24* (8), 1505-1515. doi: 10.3201/eid2408.180151.

25. Paauw, A.; Caspers, M. P.; Leverstein-van Hall, M. A.; Schuren, F. H.; Montijn, R. C.; Verhoef, J.; Fluit, A. C. Identification of resistance and virulence factors in an epidemic *Enterobacter hormaechei* outbreak strain. *Microbiology* **2009**, *155* (Pt 5), 1478-88. doi: 10.1099/mic.0.024828-0.

26. Monahan, L. G.; DeMaere, M. Z.; Cummins, M. L.; Djordjevic, S. P.; Roy Chowdhury, P.; Darling, A. E. High contiguity genome sequence of a multidrug-resistant hospital isolate of *Enterobacter hormaechei*. *Gut Pathog* **2019**, *11*, 3. doi: 10.1186/s13099-019-0288-7.

27. Mezzatesta, M. L.; Gona, F.; Stefani, S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol* **2012**, *7* (7), 887-902. doi: 10.2217/fmb.12.61.

28. Haussler, S.; Fuqua, C. Biofilms 2012: new discoveries and significant wrinkles in a dynamic field. *J Bacteriol* **2013**, *195* (13), 2947-58. doi: 10.1128/JB.00239-13.

29. Serra, D. O.; Hengge, R. Stress responses go three dimensional - the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environ Microbiol* **2014**, *16* (6), 1455-71. doi: 10.1111/1462-2920.12483.

30. Stalder, T.; Top, E. Plasmid transfer in biofilms: a perspective on limitations and opportunities. *NPJ Biofilms Microbiomes* **2016**, *2*. doi: 10.1038/npjbiofilms.2016.22.

31. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters version 7.1. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* **2017**.

32. Allen, B. L.; Gerlach, G. F.; Clegg, S. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **1991**, *173* (2), 916-20. doi: 10.1128/jb.173.2.916-920.1991
33. Duguid, J. P. Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains. *J Gen Microbiol* **1959**, *21*, 271-86. doi: 10.1099/00221287-21-1-271.
34. Adegbola, R. A.; Old, D. C. Fimbrial haemagglutinins in *Enterobacter* species. *J Gen Microbiol* **1983**, *129* (7), 2175-80. doi: 10.1099/00221287-129-7-2175.
35. Hornick, D. B.; Allen, B. L.; Horn, M. A.; Clegg, S. Fimbrial types among respiratory isolates belonging to the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* **1991**, *29* (9), 1795-800.
36. Burmolle, M.; Bahl, M. I.; Jensen, L. B.; Sorensen, S. J.; Hansen, L. H. Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains. *Microbiology* **2008**, *154* (Pt 1), 187-95. doi: 10.1099/mic.0.2007/010454-0.
37. Hornick, D. B.; Thommandru, J.; Smits, W.; Clegg, S. Adherence properties of an mrkD-negative mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* **1995**, *63* (5), 2026-32.
38. Boll, E. J.; Marti, R.; Hasman, H.; Overballe-Petersen, S.; Stegger, M.; Ng, K.; Knochel, S.; Krogfelt, K. A.; Hummerjohann, J.; Struve, C. Turn Up the Heat-Food and Clinical *Escherichia coli* Isolates Feature Two Transferrable Loci of Heat Resistance. *Front Microbiol* **2017**, *8*, 579. doi: 10.3389/fmicb.2017.00579.
39. Jagnow, J.; Clegg, S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology* **2003**, *149* (Pt 9), 2397-405. doi: 10.1099/mic.0.26434-0.
40. Di Martino, P.; Cafferini, N.; Joly, B.; Darfeuille-Michaud, A. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res Microbiol* **2003**, *154* (1), 9-16. doi: 10.1016/S0923-2508(02)00004-9.
41. Azevedo, P. A. A.; Furlan, J. P. R.; Oliveira-Silva, M.; Nakamura-Silva, R.; Gomes, C. N.; Costa, K. R. C.; Stehling, E. G.; Pitondo-Silva, A. Detection of virulence and beta-lactamase encoding genes in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Brazil. *Braz J Microbiol* **2018**, *49 Suppl 1*, 224-228. doi: 10.1016/j.bjm.2018.04.009.
42. Serra, D. O.; Richter, A. M.; Klauck, G.; Mika, F.; Hengge, R. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *MBio* **2013**, *4* (2), e00103-13. doi: 10.1128/mBio.00103-13.
43. Schaufler, K.; Semmler, T.; Pickard, D. J.; de Toro, M.; de la Cruz, F.; Wieler, L. H.; Ewers, C.; Guenther, S. Carriage of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Plasmids Does Not Reduce Fitness but Enhances Virulence in Some Strains of Pandemic *E. coli* Lineages. *Front Microbiol* **2016**, *7*, 336. doi: 10.3389/fmicb.2016.00336.
44. Bokranz, W.; Wang, X.; Tschape, H.; Romling, U. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *J Med Microbiol* **2005**, *54* (Pt 12), 1171-82. doi: 10.1099/jmm.0.46064-0.
45. Cabeen, M. T.; Leiman, S. A.; Losick, R. Colony-morphology screening uncovers a role for the *Pseudomonas aeruginosa* nitrogen-related phosphotransferase system in biofilm formation. *Mol Microbiol* **2016**, *99* (3), 557-70. doi: 10.1111/mmi.13250.

46. Zogaj, X.; Bokranz, W.; Nimtz, M.; Romling, U. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect Immun* **2003**, *71* (7), 4151-8.
47. Richter, A. M.; Povolotsky, T. L.; Wieler, L. H.; Hengge, R. Cyclic-di-GMP signalling and biofilm-related properties of the Shiga toxin-producing 2011 German outbreak *Escherichia coli* O104:H4. *EMBO Mol Med* **2014**, *6* (12), 1622-37. doi: 10.15252/emmm.201404309.
48. Freese, P. D.; Korolev, K. S.; Jimenez, J. I.; Chen, I. A. Genetic drift suppresses bacterial conjugation in spatially structured populations. *Biophys J* **2014**, *106* (4), 944-54. doi: 10.1016/j.bpj.2014.01.012.
49. Krone, S. M.; Lu, R.; Fox, R.; Suzuki, H.; Top, E. M. Modelling the spatial dynamics of plasmid transfer and persistence. *Microbiology* **2007**, *153* (Pt 8), 2803-16. doi: 10.1099/mic.0.2006/004531-0.
50. Ferreira, M. L.; Araujo, B. F.; Goncalves, I. R.; Royer, S.; Campos, P. A.; Machado, L. G.; Batistao, D. W. F.; Brito, C. S.; Gontijo-Filho, P. P.; Ribas, R. M. Association of Colistin-Resistant KPC Clonal Strains with Subsequent Infections and Colonization and Biofilm Production. *Microb Drug Resist* **2018**. doi: 10.1089/mdr.2018.0043.
51. Tangden, T.; Hickman, R. A.; Forsberg, P.; Lagerback, P.; Giske, C. G.; Cars, O. Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by *in vitro* time-kill experiments. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**, *58* (3), 1757-62. doi: 10.1128/AAC.00741-13.
52. Urban, C.; Mariano, N.; Rahal, J. J. In vitro double and triple bactericidal activities of doripenem, polymyxin B, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**, *54* (6), 2732-4. doi: 10.1128/AAC.01768-09.
53. Lee, C. S.; Doi, Y. Therapy of Infections due to Carbapenem-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Infect Chemother* **2014**, *46* (3), 149-64. doi: 10.3947/ic.2014.46.3.149.
54. Tascini, C.; Tagliaferri, E.; Giani, T.; Leonildi, A.; Flammini, S.; Casini, B.; Lewis, R.; Ferranti, S.; Rossolini, G. M.; Menichetti, F. Synergistic activity of colistin plus rifampin against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**, *57* (8), 3990-3. doi: 10.1128/AAC.00179-13.
55. Elemam, A.; Rahimian, J.; Doymaz, M. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **2010**, *48* (10), 3558-62. doi: 10.1128/JCM.01106-10.
56. Yang, H.; Lv, N.; Hu, L.; Liu, Y.; Cheng, J.; Ye, Y.; Li, J. *In vivo* activity of vancomycin combined with colistin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a *Galleria mellonella* model. *Infect Dis (Lond)* **2016**, *48* (3), 189-94. doi: 10.3109/23744235.2015.1103894.
57. Yang, H.; Chen, G.; Hu, L.; Liu, Y.; Cheng, J.; Ye, Y.; Li, J. Enhanced efficacy of imipenem-colistin combination therapy against multiple-drug-resistant *Enterobacter cloacae*: in vitro activity and a *Galleria mellonella* model. *J Microbiol Immunol Infect* **2018**, *51* (1), 70-75. doi: 10.1016/j.jmii.2016.01.003.
58. Benthall, G.; Touzel, R. E.; Hind, C. K.; Titball, R. W.; Sutton, J. M.; Thomas, R. J.; Wand, M. E. Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of

Pseudomonas aeruginosa and *Klebsiella pneumoniae* in *Galleria mellonella*. *Int J Antimicrob Agents* **2015**, *46* (5), 538-45. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.07.014.

59. Rozales, F. P.; Ribeiro, V. B.; Magagnin, C. M.; Pagano, M.; Lutz, L.; Falci, D. R.; Machado, A.; Barth, A. L.; Zavascki, A. P. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. *Int J Infect Dis* **2014**, *25*, 79-81. doi: 10.1016/j.ijid.2014.01.005.

60. Trentin, D. S.; Giordani, R. B.; Zimmer, K. R.; da Silva, A. G.; da Silva, M. V.; Correia, M. T.; Baumvol, I. J.; Macedo, A. J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *J Ethnopharmacol* **2011**, *137* (1), 327-35. doi: 10.1016/j.jep.2011.05.030.

61. Wang, Y.; Bao, W.; Guo, N.; Chen, H.; Cheng, W.; Jin, K.; Shen, F.; Xu, J.; Zhang, Q.; Wang, C.; An, Y.; Zhang, K.; Wang, F.; Yu, L. Antimicrobial activity of the imipenem/rifampicin combination against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* grown in planktonic and biofilm cultures. *World J Microbiol Biotechnol* **2014**, *30* (12), 3015-25. doi: 10.1007/s11274-014-1728-7.

62. White, R. L.; Burgess, D. S.; Manduru, M.; Bosso, J. A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother* **1996**, *40* (8), 1914-8.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

IV - CAPÍTULO 2 - Identification of type 1 and type 3 fimbriae of *Enterobacter hormaechei* clinical isolates

Manuscrito a ser submetido para o periódico **Frontiers in Microbiology**

Identification and Virulence Characterization of Type 1 and Type 3 Fimbriae in *Enterobacter hormaechei* Clinical Isolates

Flávia R Brust^{1,2}, Carsten Struve², Franciele P. Rozales³, afonso I. Barth³, Alexandre J. Macedo¹ and Karen A. Krogh^{2, 4*}

¹Faculty of Pharmacy and Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ² Department of Bacteria, Parasites and Fungi, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark, ³ Laboratory of Research in Bacterial Resistance, Center for Experimental Research, Clinical Hospital of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ⁴ Department of Viral and Microbiological Diagnostics, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark.

*Correspondence:

Dr. Karen A. Krogh

kak@ssi.dk

Keywords: *Enterobacter hormaechei*, type 1 fimbriae, type 3 fimbriae, biofilm, cell adhesion, *bla*_{NDM-1}

Abstract

Members of *Enterobacter cloacae* complex are frequently identified in clinical settings, representing a major infection control and therapeutic challenge. *Enterobacter hormaechei* represents the most frequent member of this complex isolated from human clinical samples. In this study we evaluated type 1 and type 3 fimbriae of *E. hormaechei* subsp. *oharae* clinical isolates harboring *bla*_{NDM-1}. According to agglutination assays, all isolates (nine) expressed type 1 fimbriae whereas only two expressed type 3 fimbriae. Four clinical isolates were able to produce biofilm and media supplemented with glucose enhanced biofilm formation of type 3 fimbriae strains. Type 1 fimbria mutant (997FΔ*fim*) and type 3 fimbria mutant (798FΔ*mrk*) were not able to form biofilm in microtiter plates however they adhered at the same extension to bladder cells than their wild-type strains. Apparently, these fimbriae are not directly involved in bacterial adhesion to these cells or the presence of only one of the two fimbrial types is enough to adhere. Plasmid profile and whole genome sequencing of some isolates were performed; one carrying only type 1 fimbriae (isolate 7F) and the other carrying type 1 and 3 fimbriae (isolate 798F). Both strains presented a plasmid with approximately 100 kb likely carrying the *bla*_{NDM-1} gene and, 798F showed an additional plasmid of approximately 130 kb which probably encodes the type 3 fimbriae operon *mrk*ABCDEF. This study provides valuable new information regarding type 1 and type 3 fimbriae in *E. hormaechei* subsp. *oharae*. The ability of this pathogen in acquiring plasmid encoding resistance and virulence genes may be responsible for their importance as nosocomial pathogens.

1 Introduction

The *Enterobacter cloacae* complex (ECC) is composed by different species and subspecies which are all genetically and phenotypically closely related to each other (Kremer and Hoffmann, 2012). Classification of the members belonging to the ECC is challenging and is constantly being revised. Studies showed that the most frequently species isolated from humans is *Enterobacter hormaechei* (Hoffmann and Roggenkamp, 2003; Morand et al., 2009; Ohad et al., 2014; Chavda et al., 2016).

Enterobacter spp. are the sixth most common cause of bacterial health care-associated infections (Weiner et al., 2016) and are increasingly recognized as nosocomial pathogens representing the third major Enterobacteriaceae species involved with infections after *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* (Moradigaravand et al., 2016).

The emergence of carbapenemase producing bacteria, especially New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1), worldwide, represents a clear epidemiologic threat (Peleg and Hooper, 2010; Khan et al., 2017). Carbapenem resistant Enterobacteriaceae can cause a number of serious infection types (such as intra-abdominal infections, pneumonia, urinary tract infections, and device-associated infections) or asymptomatic colonization (Morrill et al., 2015). *Enterobacter* spp. represent the second most prevalent carbapenemase producing Enterobacteriaceae (Chavda et al., 2016; Martirosov and Lodise, 2016) and infections caused by resistant pathogens are associated with poor outcomes and high mortality (Lazarovitch et al., 2015). Despite of the clinical importance few virulence factors have been identified and characterized within the ECC (Kremer and Hoffmann, 2012; Moradigaravand et al., 2016).

Adhesion is a prerequisite for bacterial infection and many Gram-negative rods adhere to biotic and abiotic surfaces by extracellular appendices i.e. fimbrial adhesins. Fimbriae are important virulence factors because they facilitate host-pathogen interactions that are crucial for the establishment and persistence of an infection, and also play a key role in biofilm formation (Klemm and Schembri, 2000; Kline et al., 2009; Thanassi et al., 2012).

Type 1 and type 3 fimbriae are fimbrial adhesins belonging to the chaperone/usher class fimbriae. Type 1 fimbriae are encoded by *fim* gene cluster and FimH is the adhesin that mediates bacterial adhesion to mannose receptors on host cells (Klemm et al., 1990; Krogfelt et al., 1990; Madison et al., 1994). These fimbriae are expressed by many members of the *Enterobacteriaceae*. In *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*, *fim* gene cluster has the same function and assembly mechanisms; however they differ in gene organization (Kisiela et al., 2013). Paauw et al. evaluated an *E. hormaechei* strain that caused an outbreak in Netherlands and identified four DNA fragments encoding putative fimbriae. These fimbriae had most homology with type 1 fimbriae of *S. enterica* (Paauw et al., 2009).

Type 3 fimbriae were initially identified in *Klebsiella pneumoniae* strains and are characterized as being resistant to mannose inhibition of binding (Duguid, 1959). This adhesin is present in practically all *K. pneumoniae* isolates and its expression promotes attachment to abiotic and biotic surfaces and biofilm formation (Di Martino et al., 2003; Jagnow and Clegg, 2003; Schroll et al., 2010). Type 3 fimbriae are encoded by the *mrkABCDF* gene cluster (Allen et al., 1991) but, the receptor for these fimbriae has not been identified yet (Stahlhut et al., 2013). In *K. pneumoniae*, this gene cluster is chromosomally encoded (Hornick et al., 1995). Type 3 fimbriae have also been reported in other members of the *Enterobacteriaceae* family including *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., and *Escherichia coli* isolates (Adegbola and Old, 1983; Hornick et al., 1991; Burmolle et al., 2008); however, they are not generally found in these species but appear to have been acquired by specific strains.

Thus, in *E. coli* type 3 fimbriae have been described to be encoded by conjugative plasmids (Burmolle et al., 2008; Madsen et al., 2016; Boll et al., 2017).

Fimbrial expression can be determined by specific agglutination of red blood cells (RBCs) from different animal species and whether the agglutination reaction is inhibited by mannose. Type 1 fimbriae are characterized by mannose-sensitive agglutination of guinea pig RBCs as well as yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) (Krogfelt et al., 1990), whereas type 3 fimbriae are characterized by agglutination with tannic acid-treated RBCs (Allen et al., 1991), commercially available sheep RBCs and yeast in a mannose-resistant manner (Stahlhut et al., 2012a).

Considering the high prevalence of carbapenemase-producing ECC strains and the importance of this complex in health care-associated infections we evaluated expression and the role of *E. hormaechei* subsp. *oharae* type 1 and type 3 fimbriae in biofilm formation and in adhesion to bladder cells.

2 Materials and methods

2.1 Bacterial strains and growth conditions

The clinical isolates used in this study are listed in **table 1**. They were obtained from three distinct hospitals from Porto Alegre (Rio Grande do Sul the southernmost state of Brazil) and were identified as *E. hormaechei* subsp. *oharae* (unpublished data) harboring the *bla*_{NDM-1} gene. Six from the nine isolates were recovered from rectal swabs of surveillance culture of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*; one was obtained from the nosocomial environment and the other two were recovered from urine and cerebrospinal fluid. Eight clinical isolates showed the same clonal profile by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) (Rozales et al., 2014).

All strains were stored at - 80 °C and were routinely cultured at 37 °C on Luria-Bertani (LB) agar or LB broth.

2.2 Agglutination Assays

Agglutination assays were performed as previously described (Stahlhut et al., 2012a). Briefly, bacterial culture was applied to a glass slide and mixed with 0.5 % yeast (Sigma-Aldrich) or 0.5 % sheep RBCs (Sigma-Aldrich). The slide was gently rotated until agglutination was visible. Agglutination assays were performed in the presence or absence of 10 % mannose.

2.3 Biofilm formation in microtiter plates

BIOFILM FORMATION WAS CARRIED OUT ACCORDING Boll et al. (Boll et al., 2013) with some modifications. Overnight cultures of strains grown in LB broth were added to 96-well plates containing LB, LB supplemented with glucose (0.02 M) or M9 minimal medium supplemented with glucose (0.02 M) and MgSO₄ (0.002 M). Plates were incubated at 37 °C for 24 h with shaking (100 rpm). After incubation, the plates were washed with saline to remove unbound bacteria and the biofilm was stained with 0.1 % crystal violet (CV; Sigma-Aldrich). Staining was followed by washes with saline and the biofilm formation was quantified by dissolving the CV in 96% ethanol, and optical density at 595 nm (OD₅₉₅) was measured. Commensal *E. coli* strain MG1655 and enteroaggregative *E. coli* (EAEC) strain 042 were used as negative and strong biofilm former controls, respectively.

2.4 Cell adhesion assays

The cell adhesion assay was performed as previously described (Boll et al., 2013). The human bladder cancer-derived epithelial cell line ATCC 5637 was maintained in RPMI 1640 medium (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum (FBS). For the adhesion assays, cells were grown to 90 to 100% confluence in 24-well plates, washed, supplied with 1 ml fresh culture medium, and infected with 25 μ l of bacterial suspensions (2×10^6 bacteria) at 37 °C for 3 h. For quantification of the total number of bacteria, Triton X-100 (0.5% final concentration) was added to wells containing both cell-associated and nonadhering bacteria, followed by a 10-min lysis step. For quantification of cell-associated bacteria using other wells, nonadhering bacteria were removed by washing 3 times with phosphate-buffered saline (PBS; Gibco) and incubated with 1 ml of 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in RPMI medium for 10 min. Serial dilutions of lysed cells and bacteria were plated and colony counted the following day.

2.5 Genome sequencing

Genomic DNA was extracted from three *E. hormaechei* subsp. *oharae* isolates (7F, 798F and 997F) using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) and fragment libraries were constructed using a Nextera™ kit (Illumina, Little Chesterford, UK) followed by 251-bp paired end sequencing (MiSeq; Illumina) according to the manufacturer's instructions. Reads were assembled *de novo* using CLC Genomics Workbench 7.5.

2.6 Plasmid profiling

Plasmid preparation was performed as previously described (Kado and Liu, 1981), followed by electrophoresis in a 0.7% agarose gel and stained with GelRed (Biotium). The approximate size of each plasmids were determined by comparing with the reference *E. coli* strain 39R861, harboring four plasmids of 147, 63, 36 and 7 kb (Macrina et al., 1978).

2.7 Construction of isogenic fimbriae mutants

The procedure used to construct the fimbriae mutants of strains *E. hormaechei* subsp. *oharae* 798F and 997F was previously described (Struve et al., 2009).

Briefly, the type 1 fimbrial gene cluster in *E. hormaechei* subsp. *oharae* 997F was deleted by allelic exchange with a kanamycin resistance gene (*kan*)-encoding cassette flanked by regions homologous to the regions up- and downstream the *fim* gene cluster. The cassette was generated by a three step PCR procedure. As the first step, the *kan* gene was amplified from pKD4 using the primer pair Kn1 and Kn2 (Datsenko & Wanner, 2000). Secondly, from 997F, DNA flanking the *fim* gene cluster was amplified by PCR using primer pairs Upfim-F/Upfim-R and Dwfim-F/Dwfim-R, respectively. At their 5' ends, primers Upfim-R and Dwfim-F contained 20 bp regions homologous to the extremities of the *kan* gene. In the third step, the flanking regions were added on each side of the *kan* gene by mixing the fragments, followed by PCR amplification using primer pair Upfim-F and Dwfim-R. The PCR product was purified and electroporated into 997F harboring the thermosensitive plasmid pKOBEGApra encoding the lambda Red recombinase. The 997F *fim* mutant was selected by growth on LB plates containing kanamycin (50 μ g/mL) at 37 °C. Loss of the pKOBEGApra plasmid was verified by the inability of the mutant to grow on LB agar plates containing apramycin (30 μ g/mL). Correct allelic exchange was verified by PCR analysis using control primers (fim-C-F/fim-C-R).

To construct the type 3 fimbria mutant the *mrk* gene cluster in *E. hormaechei* subsp. *oharae* 798F was deleted by allelic exchange with apramycin resistance-encoding cassette. The

procedure was essentially as described above. The apramycin resistance-encoding cassette was amplified from pIJ773 using the primer pair ApraF/ApraR. The thermosensitive plasmid pACBSR-Hyg encoding the lambda Red recombinase and the hygromycin B resistance-cassette was used (Huang et al., 2014). All primers used to construct the mutants are listed in **Table 2**.

2.8 Statistical analyses

Data were analyzed by performing Student's t test or Two-Way ANOVA using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Results were considered significant when $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***), $P < 0.0001$ (****).

3 Results

3.1 *E. hormaechei* subsp. *oharae* clinical isolates express type 1 and type 3 fimbriae and produce biofilm

To investigate fimbrial expression in *E. hormaechei* subsp. *oharae* agglutination assays were performed. All clinical isolates were found to agglutinate yeast in a mannose-sensitive manner indicating expression of type 1 fimbriae. Two clinical isolates (798F and 977F) also exhibited agglutination of sheep RBCs in a mannose-resistant manner indicating that these isolates express type 3 fimbriae (**Table 3**). The 798F and 977F were isolated from urine and rectal swab, respectively, from patients of the same hospital.

The ability to form biofilm was determined in microtiter plates using LB and M9 media. In LB medium, four isolates (798F, 821F, 977F and 997F) were found to form significant biofilm comparing with blank. Interestingly, in M9 supplemented with glucose only the two strains expressing type 3 fimbriae (798F and 977F) were able to form biofilm (**Figure 1A**). We also tested LB supplemented with glucose to investigate if type 3 fimbriae expression was stimulated by this carbohydrate. The results showed that 798F and 977F biofilm formation was significantly higher indicating that glucose increase type 3 fimbriae expression (**Figure 1B**). The 7F isolate did not produce type 3 fimbriae and did not show difference in biofilm formation between LB and LB supplemented with glucose.

3.2 Type 3 fimbriae gene cluster seems to be located on a plasmid in *E. hormaechei* subsp. *oharae*

The experiments above showed that isolates with the same clonal profile presented phenotypic difference regarding fimbriae expression and biofilm formation. In order to understand these findings we selected some isolates for further experiments. At first, 997F (type 1 fimbriae) was chosen but genome sequencing showed that this isolate lost *bla*_{NDM-1} gene, so we selected 7F (type 1 fimbriae) in addition to 798F (type 1 and type 3 fimbriae).

Plasmid profiling and Illumina-based whole-genome sequencing were performed for these three isolates. The plasmid profile showed that 7F and 798F harbor a plasmid of ~ 100 kb and 798F also harbors a plasmid of ~130 kb (**Figure 2**). The isolate 997F harbors a plasmid of ~ 60 kb.

BLAST analysis of 7F and 798F genomes showed a region with high similarity to pEh1A (GenBank accession number KR822246), a circular 96,124-bp plasmid that carries *bla*_{NDM-1} gene found in *E. hormaechei* isolate from Brazil (Campos et al., 2015). Therefore, it is likely that the plasmid of ~100 kb carries the *bla*_{NDM-1} gene. As mentioned before, this carbapenemase gene was not identified in 997F genome sequence therefore.

A type 1 fimbria gene cluster was identified in the genome sequence of all isolates and it was found to be more related to the *fim* cluster of *Salmonella enterica* than *E. coli*. A type 3 fimbriae gene cluster was identified in 798F and it was very similar to the *mrk* gene cluster of *K. pneumoniae*. It could be speculated that the type 3 fimbriae gene cluster is encoded by the 130 kb plasmid found in this strain.

3.3 Type 1 fimbria mutant and type 3 fimbria mutant are not able to produce biofilm

To investigate the role of type 1 and type 3 fimbriae in *E. hormaechei* biofilm formation, isogenic type 1 fimbria mutant (997F Δ *fim*) and type 3 fimbria mutant (798F Δ *mrk*) were constructed by allelic exchange as described in Materials and Methods. To verify disruption of fimbrial expression in the mutants agglutination assays were performed. The 997F wild-type strain exhibited mannose-sensitive yeast agglutination while Δ *fim* mutant was unable to agglutinate. Likewise, 798F wild-type strain agglutinated with sheep RBCs in mannose-resistant manner whereas the Δ *mrk* mutant was unable to agglutinate.

Comparison of biofilm formation by 798F and its isogenic type 3 fimbria mutant (798F Δ *mrk*) revealed that type 3 fimbriae play a pronounced role in *E. hormaechei* subsp. *oharae* biofilm formation (**Figure 1C**). Thus, 798F Δ *mrk* exhibited a striking reduction in biofilm formation compared to the wild-type strain in LB ($P = 0.0020$) and in M9 media ($P = 0.00080$) confirming that expression of type 3 fimbriae strongly promotes biofilm formation.

Biofilm formation was also compared between 997F and its isogenic type 1 fimbria mutant (997F Δ *fim*). The 997F Δ *fim* showed a reduction in biofilm formation compared to the wild-type strain ($P = 0.0332$). Therefore, type 1 fimbriae also are involved in biofilm formation of *E. hormaechei* subsp. *oharae* (**Figure 1D**).

3.4 Type 1 and type 3 fimbria are not directly involved in adhesion to bladder epithelial cells

The ability of *E. hormaechei* subsp. *oharae* isolates (7F, 798F and 997F) to adhere to bladder epithelial cells was determined. We found that these isolates adhered to bladder cells to the same extent as EAEC strain 042, a strain well known by its adhesive properties. To further characterize the role of type 1 and type 3 fimbriae we assessed the ability of wild-type and mutants strains to adhere to bladder epithelial cells. There was no difference in adhesion of 798F wild-type and 798F Δ *mrk* neither for 997F wild-type and 997F Δ *fim*. Data shown in **Figure 3** are the numbers of cell-associated bacteria relative to the total numbers of bacteria recovered.

4 Discussion

Bacteria belonging to the *Enterobacter cloacae* complex are important pathogen frequently associated with nosocomial outbreaks around the world (Paauw et al., 2006; van der Meer-Marquet et al., 2006; Campos et al., 2007; Townsend et al., 2008). These pathogens are spread via horizontal transfer and are often associated with multidrug resistant profile, which increases the challenges associated with treatment by limiting therapeutic options (Townsend et al., 2008; Lazarovitch et al., 2015). Despite the increasing clinical importance of ECC little is known about their virulence mechanisms. In this context, we investigated expression and the role of type 1 and type 3 fimbriae in *E. hormaechei* subsp. *oharae* clinical isolates.

Type 1 fimbriae were expressed by all isolates of this study regardless the tissue/organ they were collected from. DNA sequence revealed that *E. hormaechei* subsp. *oharae* *fim* gene

cluster is similar to *S. enterica* type 1 fimbria. This had to the best of our knowledge not been reported before. Many species of *Enterobacteriaceae* use these fimbriae to attach to surfaces as well as to liquid/air and liquid/liquid interfaces (McLay et al., 2018). Type 1 fimbriae represent a crucial virulence mechanism allowing bacteria to attach to variety of host cells (Althouse et al., 2003; Korea et al., 2010) and to evade antibiotics during initial infection (Vizcarra et al., 2016). Several studies have demonstrated the importance of these fimbriae in *E. coli* and *K. pneumoniae* urinary tract infection (Struve et al., 2008; 2009).

In this study, two isolates expressed type 3 fimbriae; they were obtained from patients of the same hospital. Type 3 fimbriae facilitate bacteria adhesion to a range of biotic and abiotic substrates, including collagen, silicone, and hard plastics (Di Martino et al., 2003; Jagnow and Clegg, 2003) and enhance biofilm formation in several *Enterobacteriaceae* species (Burmolle et al., 2008; Schroll et al., 2010; Stahlhut et al., 2012b). As mentioned above the isolates of *E. hormaechei* subsp. *oharae* expressing type 3 fimbriae were recovered from rectal swab and from urinary tract. These fimbriae have previously been implicated with catheter-associated urinary tract infection (Stahlhut et al., 2012b). Biofilm growth mediated by type 3 fimbriae may be important for the survival of these bacteria on the surface of urinary catheters and within the hospital environment (Ong et al., 2010; Stahlhut et al., 2012a; Murphy et al., 2013).

We observed that type 1 and type 3 fimbriae enhanced biofilm formation in *E. hormaechei* subsp. *oharae* since Δfim mutant and Δmrk mutant were not able to form biofilm unlike their wild-type strains. Biofilm formation of *E. hormaechei* subsp. *oharae* expressing type 3 fimbriae was stimulated by glucose-rich medium. Lin et al showed that external glucose elevates the intracellular concentration of c-di-GMP and the expression of MrkH and MrkI, resulting in a high expression of type 3 fimbriae in *K. pneumoniae* (Lin et al., 2016).

E. hormaechei subsp. *oharae* presented a high ability to adhere to bladder cells. This ability represents an important virulence factor since adherence to epithelial surfaces represents the first step in bacteria pathogenesis. In contrast with the results of biofilm formation in microtiter plates, wild-type strains did not show difference in adhering ability to bladder cells comparing with type 1 or type 3 fimbriae mutants. Probably, there are other adhesins involved in this process.

Finally, genome sequencing and plasmid profile suggest that type 3 fimbriae operon *mrkABCDF* is located on a plasmid in *E. hormaechei* subsp. *oharae* representing an additional advantage for this pathogen. Sorensen et al. evaluated differences between type 3 fimbriae encoded on plasmids and in chromosomes and showed type 3 fimbriae encoded on plasmids provide more advantages to the strains (Madsen et al., 2016). Plasmids are one of the most important agents of horizontal gene transfer (Frost et al., 2005). Genes located on these mobile elements are easily to be spread and can provide a selective advantage enhancing bacterial survivability in hospital environment (Madsen et al., 2012). The ability of *E. hormaechei* subsp. *oharae* to acquire plasmids encoding resistance and virulence genes may represents an important feature for the development of outbreak strains.

5 Funding

We acknowledge to FAPERGS (1871-25511/13-4), MCTI/CNPq (408578/2013-0), Universal/CNPq (443150/2014-1), INCT – INPRA (465718/2014-0). FRB received a doctoral fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

6 Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

7 References

- Adegbola, R.A., and Old, D.C. (1983). Fimbrial haemagglutinins in *Enterobacter* species. *J Gen Microbiol* 129(7), 2175-2180. doi: 10.1099/00221287-129-7-2175.
- Allen, B.L., Gerlach, G.F., and Clegg, S. (1991). Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* 173(2), 916-920. doi: 10.1128/jb.173.2.916-920.1991
- Althouse, C., Patterson, S., Fedorka-Cray, P., and Isaacson, R.E. (2003). Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine *in vivo*. *Infect Immun* 71(11), 6446-6452. doi: 10.1128/IAI.71.11.6446-6452.2003.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., et al. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277(5331), 1453-1462. doi: 10.1126/science.277.5331.1453.
- Boll, E.J., Marti, R., Hasman, H., Overballe-Petersen, S., Stegger, M., Ng, K., et al. (2017). Turn Up the Heat-Food and Clinical *Escherichia coli* Isolates Feature Two Transferrable Loci of Heat Resistance. *Front Microbiol* 8, 579. doi: 10.3389/fmicb.2017.00579.
- Boll, E.J., Struve, C., Boisen, N., Olesen, B., Stahlhut, S.G., and Krogfelt, K.A. (2013). Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. *Infect Immun* 81(4), 1164-1171. doi: 10.1128/IAI.01376-12.
- Boyer, H.W., and Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41(3), 459-472. doi: 10.1016/0022-2836(69)90288-5.
- Burmolle, M., Bahl, M.I., Jensen, L.B., Sorensen, S.J., and Hansen, L.H. (2008). Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains. *Microbiology* 154(Pt 1), 187-195. doi: 10.1099/mic.0.2007/010454-0.
- Campos, J.C., da Silva, M.J., dos Santos, P.R., Barros, E.M., Pereira Mde, O., Seco, B.M., et al. (2015). Characterization of Tn3000, a Transposon Responsible for blaNDM-1 Dissemination among Enterobacteriaceae in Brazil, Nepal, Morocco, and India. *Antimicrob Agents Chemother* 59(12), 7387-7395. doi: 10.1128/AAC.01458-15.
- Campos, L.C., Lobianco, L.F., Seki, L.M., Santos, R.M., and Asensi, M.D. (2007). Outbreak of *Enterobacter hormaechei* septicaemia in newborns caused by contaminated parenteral nutrition in Brazil. *J Hosp Infect* 66(1), 95-97. doi: 10.1016/j.jhin.2007.02.013.
- Chavda, K.D., Chen, L., Fouts, D.E., Sutton, G., Brinkac, L., Jenkins, S.G., et al. (2016). Comprehensive Genome Analysis of Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp.: New Insights into Phylogeny, Population Structure, and Resistance Mechanisms. *MBio* 7(6). doi: 10.1128/mBio.02093-16.
- Chaverroche, M.K., Ghigo, J.M., and d'Enfert, C. (2000). A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* 28(22), E97. doi: 10.1093/nar/28.22.e97.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12), 6640-6645. doi: 10.1073/pnas.120163297.

- Di Martino, P., Cafferini, N., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (2003). *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res Microbiol* 154(1), 9-16. doi: 10.1016/S0923-2508(02)00004-9.
- Duguid, J.P. (1959). Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains. *J Gen Microbiol* 21, 271-286. doi: 10.1099/00221287-21-1-271.
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., and Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 3(9), 722-732. doi: 10.1038/nrmicro1235.
- Gust, B., Challis, G.L., Fowler, K., Kieser, T., and Chater, K.F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4), 1541-1546. doi: 10.1073/pnas.0337542100.
- Hoffmann, H., and Roggenkamp, A. (2003). Population genetics of the nomenclotype *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol* 69(9), 5306-5318. doi: 10.1128/AEM.69.9.5306-5318.2003.
- Hornick, D.B., Allen, B.L., Horn, M.A., and Clegg, S. (1991). Fimbrial types among respiratory isolates belonging to the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 29(9), 1795-1800.
- Hornick, D.B., Thommandru, J., Smits, W., and Clegg, S. (1995). Adherence properties of an mrkD-negative mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 63(5), 2026-2032.
- Huang, T.W., Lam, I., Chang, H.Y., Tsai, S.F., Palsson, B.O., and Charusanti, P. (2014). Capsule deletion via a lambda-Red knockout system perturbs biofilm formation and fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578. *BMC Res Notes* 7, 13. doi: 10.1186/1756-0500-7-13.
- Jagnow, J., and Clegg, S. (2003). *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology* 149(Pt 9), 2397-2405. doi: 10.1099/mic.0.26434-0.
- Kado, C.I., and Liu, S.T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 145(3), 1365-1373.
- Khan, A.U., Maryam, L., and Zarrilli, R. (2017). Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol* 17(1), 101. doi: 10.1186/s12866-017-1012-8.
- Kisiela, D.I., Chattopadhyay, S., Tchesnokova, V., Paul, S., Weissman, S.J., Medenica, I., et al. (2013). Evolutionary analysis points to divergent physiological roles of type 1 fimbriae in *Salmonella* and *Escherichia coli*. *MBio* 4(2). doi: 10.1128/mBio.00625-12.
- Klemm, P., Krogfelt, K.A., Hedegaard, L., and Christiansen, G. (1990). The major subunit of *Escherichia coli* type 1 fimbriae is not required for D-mannose-specific adhesion. *Mol Microbiol* 4(4), 553-559. doi: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00623.x.
- Klemm, P., and Schembri, M.A. (2000). Bacterial adhesins: function and structure. *Int J Med Microbiol* 290(1), 27-35. doi: 10.1016/S1438-4221(00)80102-2.
- Kline, K.A., Falker, S., Dahlberg, S., Normark, S., and Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 5(6), 580-592. doi: 10.1016/j.chom.2009.05.011.
- Korea, C.G., Badouraly, R., Prevost, M.C., Ghigo, J.M., and Beloin, C. (2010). *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. *Environ Microbiol* 12(7), 1957-1977. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02202.x.
- Kremer, A.N., and Hoffmann, H. (2012). Subtractive hybridization yields a silver resistance determinant unique to nosocomial pathogens in the *Enterobacter cloacae* complex. *J Clin Microbiol* 50(10), 3249-3257. doi: 10.1128/JCM.00885-12.
- Krogfelt, K.A., Bergmans, H., and Klemm, P. (1990). Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect Immun* 58(6), 1995-1998.
- Lazarovitch, T., Amity, K., Coyle, J.R., Ackerman, B., Tal-Jasper, R., Ofer-Friedman, H., et al. (2015). The Complex Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacter* Infections: A Multicenter Descriptive Analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 36(11), 1283-1291. doi: 10.1017/ice.2015.186.

- Lin, C.T., Lin, T.H., Wu, C.C., Wan, L., Huang, C.F., and Peng, H.L. (2016). CRP-Cyclic AMP Regulates the Expression of Type 3 Fimbriae via Cyclic di-GMP in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One* 11(9), e0162884. doi: 10.1371/journal.pone.0162884.
- Macrina, F.L., Kopecko, D.J., Jones, K.R., Ayers, D.J., and McCowen, S.M. (1978). A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid* 1(3), 417-420. doi: 10.1016/0147-619X(78)90056-2
- Madison, B., Ofek, I., Clegg, S., and Abraham, S.N. (1994). Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar-binding specificities of their FimH adhesins. *Infect Immun* 62(3), 843-848.
- Madsen, J.S., Burmolle, M., Hansen, L.H., and Sorensen, S.J. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65(2), 183-195. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x.
- Madsen, J.S., Riber, L., Kot, W., Basfeld, A., Burmolle, M., Hansen, L.H., et al. (2016). Type 3 Fimbriae Encoded on Plasmids Are Expressed from a Unique Promoter without Affecting Host Motility, Facilitating an Exceptional Phenotype That Enhances Conjugal Plasmid Transfer. *PLoS One* 11(9), e0162390. doi: 10.1371/journal.pone.0162390.
- Martirosov, D.M., and Lodise, T.P. (2016). Emerging trends in epidemiology and management of infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 85(2), 266-275. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.008.
- McLay, R.B., Nguyen, H.N., Jaimes-Lizcano, Y.A., Dewangan, N.K., Alexandrova, S., Rodrigues, D.F., et al. (2018). Level of Fimbriation Alters the Adhesion of *Escherichia coli* Bacteria to Interfaces. *Langmuir* 34(3), 1133-1142. doi: 10.1021/acs.langmuir.7b02447.
- Moradigaravand, D., Reuter, S., Martin, V., Peacock, S.J., and Parkhill, J. (2016). The dissemination of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* throughout the UK and Ireland. *Nat Microbiol* 1, 16173. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.173.
- Morand, P.C., Billoet, A., Rottman, M., Sivadon-Tardy, V., Eyrolle, L., Jeanne, L., et al. (2009). Specific distribution within the *Enterobacter cloacae* complex of strains isolated from infected orthopedic implants. *J Clin Microbiol* 47(8), 2489-2495. doi: 10.1128/JCM.00290-09.
- Morrill, H.J., Pogue, J.M., Kaye, K.S., and LaPlante, K.L. (2015). Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. *Open Forum Infect Dis* 2(2), ofv050. doi: 10.1093/ofid/ofv050.
- Murphy, C.N., Mortensen, M.S., Krogfelt, K.A., and Clegg, S. (2013). Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. *Infect Immun* 81(8), 3009-3017. doi: 10.1128/IAI.00348-13.
- Nataro, J.P., Baldini, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E., Bravo, N., and Levine, M.M. (1985). Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. *J Infect Dis* 152(3), 560-565. doi: 10.1093/infdis/152.3.560.
- Ohad, S., Block, C., Kravitz, V., Farber, A., Pilo, S., Breuer, R., et al. (2014). Rapid identification of *Enterobacter hormaechei* and *Enterobacter cloacae* genetic cluster III. *J Appl Microbiol* 116(5), 1315-1321. doi: 10.1111/jam.12439.
- Ong, C.L., Beatson, S.A., Totsika, M., Forestier, C., McEwan, A.G., and Schembri, M.A. (2010). Molecular analysis of type 3 fimbrial genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Citrobacter* species. *BMC Microbiol* 10, 183. doi: 10.1186/1471-2180-10-183.
- Paauw, A., Caspers, M.P., Leverstein-van Hall, M.A., Schuren, F.H., Montijn, R.C., Verhoef, J., et al. (2009). Identification of resistance and virulence factors in an epidemic *Enterobacter hormaechei* outbreak strain. *Microbiology* 155(Pt 5), 1478-1488. doi: 10.1099/mic.0.024828-0.
- Paauw, A., Fluit, A.C., Verhoef, J., and Leverstein-van Hall, M.A. (2006). *Enterobacter cloacae* outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Dutch hospital. *Emerg Infect Dis* 12(5), 807-812. doi: 10.3201/eid1205.050910.

- Peleg, A.Y., and Hooper, D.C. (2010). Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med* 362(19), 1804-1813. doi: 10.1056/NEJMra0904124.
- Rozales, F.P., Ribeiro, V.B., Magagnin, C.M., Pagano, M., Lutz, L., Falci, D.R., et al. (2014). Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. *Int J Infect Dis* 25, 79-81. doi: 10.1016/j.ijid.2014.01.005.
- Schroll, C., Barken, K.B., Krogfelt, K.A., and Struve, C. (2010). Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol* 10, 179. doi: 10.1186/1471-2180-10-179.
- Stahlhut, S.G., Chattopadhyay, S., Kisiela, D.I., Hvidtfeldt, K., Clegg, S., Struve, C., et al. (2013). Structural and population characterization of MrkD, the adhesive subunit of type 3 fimbriae. *J Bacteriol* 195(24), 5602-5613. doi: 10.1128/JB.00753-13.
- Stahlhut, S.G., Struve, C., and Krogfelt, K.A. (2012a). *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbriae agglutinate yeast in a mannose-resistant manner. *J Med Microbiol* 61(Pt 3), 317-322. doi: 10.1099/jmm.0.036350-0.
- Stahlhut, S.G., Struve, C., Krogfelt, K.A., and Reisner, A. (2012b). Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65(2), 350-359. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00965.x.
- Struve, C., Bojer, M., and Krogfelt, K.A. (2008). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect Immun* 76(9), 4055-4065. doi: 10.1128/IAI.00494-08.
- Struve, C., Bojer, M., and Krogfelt, K.A. (2009). Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infect Immun* 77(11), 5016-5024. doi: 10.1128/IAI.00585-09.
- Thanassi, D.G., Bliska, J.B., and Christie, P.J. (2012). Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev* 36(6), 1046-1082. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00342.x.
- Townsend, S.M., Hurrell, E., Caubilla-Barron, J., Loc-Carrillo, C., and Forsythe, S.J. (2008). Characterization of an extended-spectrum beta-lactamase *Enterobacter hormaechei* nosocomial outbreak, and other *Enterobacter hormaechei* misidentified as *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*. *Microbiology* 154, 3659-3667. doi: 10.1099/mic.0.2008/021980-0.
- van der Mee-Marquet, N., Girard, S., Lagarrigue, F., Leroux, I., Voyer, I., Bloc, D., et al. (2006). Multiresistant *Enterobacter cloacae* outbreak in an intensive care unit associated with therapeutic beds. *Crit Care* 10(1), 405. doi: 10.1186/cc4835.
- Vizcarra, I.A., Hosseini, V., Kollmannsberger, P., Meier, S., Weber, S.S., Arnoldini, M., et al. (2016). How type 1 fimbriae help *Escherichia coli* to evade extracellular antibiotics. *Sci Rep* 6, 18109. doi: 10.1038/srep18109.
- Weiner, L.M., Webb, A.K., Limbago, B., Dudeck, M.A., Patel, J., Kallen, A.J., et al. (2016). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol* 37(11), 1288-1301. doi: 10.1017/ice.2016.174.

Table 1. Bacterial strains used in this study.

In bold: strains identification used in Rozales et al. (2014). *clonally unrelated strain

Strain or plasmid	Description	Reference
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i> strains		
1 (245F)	Sink isolate	Rozales et al. (2014)
2 (7F)	Rectal swab isolate	Rozales et al. (2014)
3 (67F)	Rectal swab isolate	Rozales et al. (2014)
4 (104F)	Rectal swab isolate	Rozales et al. (2014)
5 (798F)	Urine isolate	Rozales et al. (2014)
798F Δmrk	Apramycin marker in place of type 3 operon	This study
6 (821F)*	Cerebrospinal fluid isolate	Rozales et al. (2014)
9 (977F)	Rectal swab isolate	Rozales et al. (2014)
10 (997F)	Rectal swab isolate	Rozales et al. (2014)
997F Δfim	Kanamycin marker in place of type 1 operon	This study
11 (1105F)	Rectal swab isolate	Rozales et al. (2014)
<i>E. coli</i> strains		
HB101	Non-fimbriated, non-capsulated K-12 laboratory strain	Boyer and Roulland-Dussoix (1969)
MG1655	Commensal K-12 strain	Blattner et al. (1997)
042	Prototype EAEC strain expressing AAF/II	Nataro et al. (1985)
Plasmid		
pKOBEGpra	Thermosensitive, encoding the lambda Red recombinase	Chaveroche et al. (2000)
pKD4	Encoding the kanamycin resistance cassette	Datsenko and Wanner (2000)
pACBSRHyg	Thermosensitive, encoding the lambda Red recombinase	Huang et al. (2014)
pIJ773	Encoding the apramycin resistance cassette	Gust et al. (2003)

Table 2. Primers used in this study.

Primer	Sequence (5' ► 3')
Kn1	GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Kn2	ATGGGAATTAGCCATGGTCC
Apra-F	ATTCCGGGGATCCGTCGACC
Apra-R	TGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Upfim-F	CGTTAGAAAGGGGGGATTG
Upfim-R-Kn	GAAGCAGCTCCAGCCTACACGGAATATTGGAGGTGGTGT
Dwfim-F-Kn	GGACCATGGCTAATTCCCATATCGTATCCACTCTCCCT
Dwfim-R	CAACCACCCCATTTGATCT
fim-C-F	AACCCACCTCTTCACAC
fim-C-R	ATGCTTTTCGCTCTTCCCA
Upmrk-F	ATTTTAGATGGTTGCGGGA
Upmrk-R-Apr	GGTCGACGGATCCCCGGAATTGCAGAGAGAAGAACCCTTT
Dwmrk-F-Apr	GAAGCAGCTCCAGCCTACACTGGGTCGATGGTTTTTTT
Dwmrk-R	CGTAATAGGTGAACAGGC
mrk-C-F	CACCCAACCCTATCAACAAA
mrk-C-R	ACTAATTCCCACGTTGCC

Table 3. Agglutination patterns of individual strains

Strain	Yeast	Yeast + mannose	Sheep RBCs	Sheep RBCs + mannose	Fimbriae expressed
7F	+	-	+	-	Type 1
67F	+	-	+	-	Type 1
104F	+	-	+	-	Type 1
245F	+	-	+	-	Type 1
798F	+	-	+	+	Type 1 and type 3
821F	+	-	+	-	Type 1
977F	+	-	+	+	Type 1 and type 3
997F	+	-	+	-	Type 1
1105F	+	-	+	-	Type 1

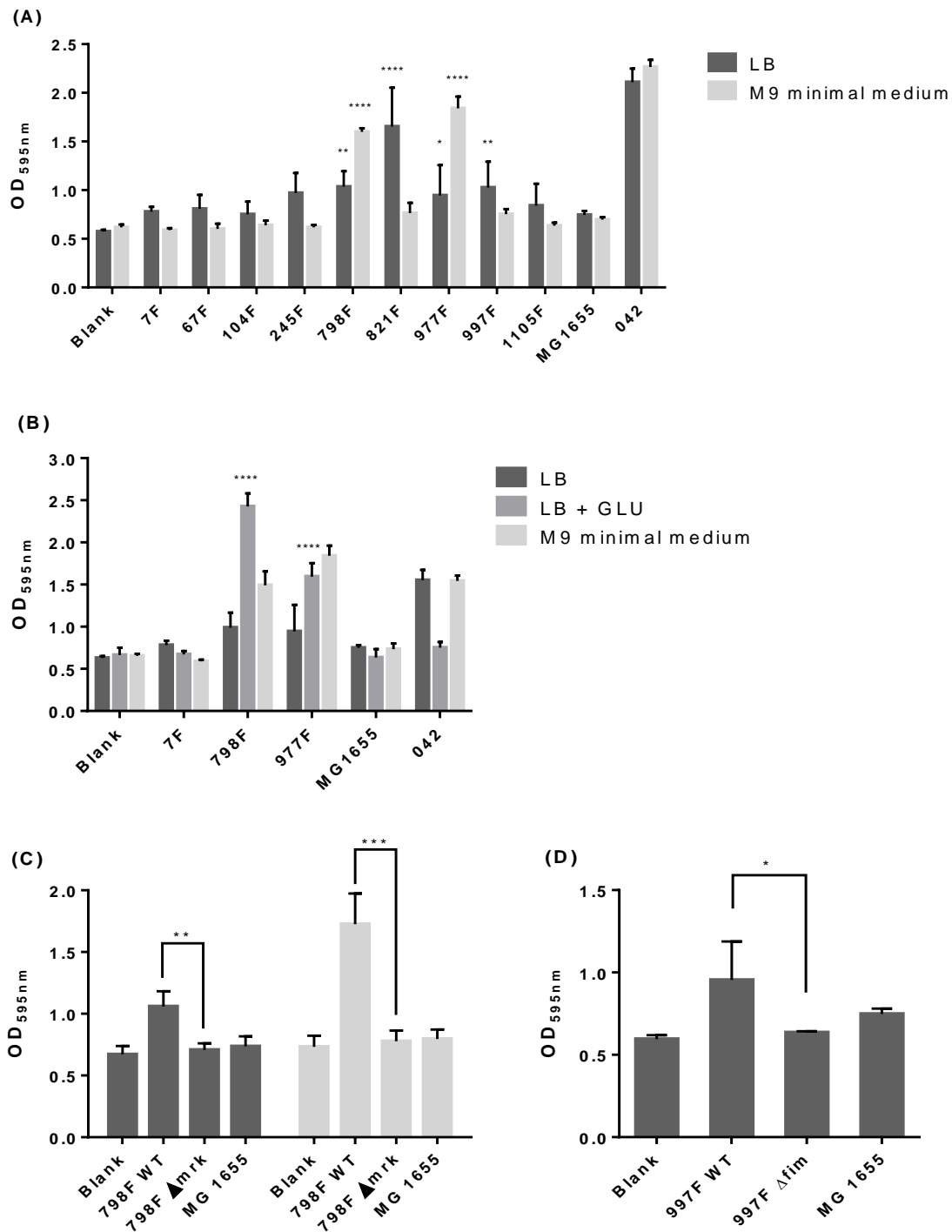


FIGURE 1. Biofilm formation of *E. hormaechei* subsp. *oharae* strains using different media (A) Biofilm of *E. hormaechei* subsp. *oharae* clinical isolates, *E. coli* MG1655 and EAEC strain 042 in LB, M9 minimal medium and (B) LB supplemented with glucose. Biofilm formation of the strains were compared with blank; (C) Biofilm formation of 798F wild-type (798F WT) and its type 3 fimbria mutant (798FΔ*mrk*); and (D) Biofilm formation of wild-type of 997F (997F WT) and its type 1 fimbria mutant (997FΔ*fim*). Strains were grown at 37 °C in microtiter plates for 24 h under shaking conditions, after which biofilm was quantified. The results are presented as the means + standard deviation. Results were considered significant when $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***), $P < 0.0001$ (****).

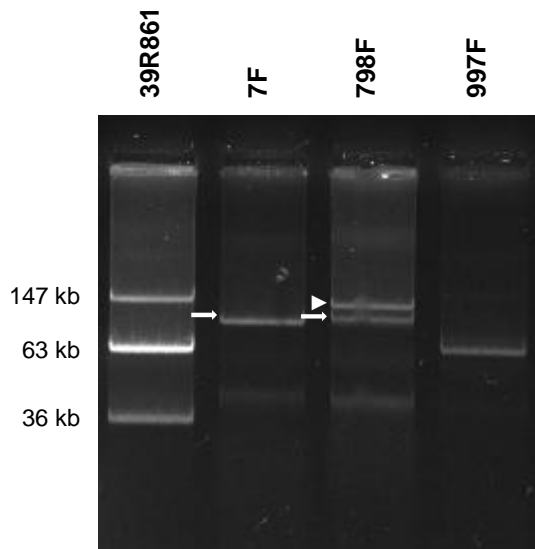


FIGURE 2. Plasmid profiles of the clinical isolates 7F, 798F and 997F. Plasmid profiles with *E. coli* 39R861 as a marker (147, 63 and 36 kb) in lane 1. The plasmid profile showed that 7F and 798F harbored a plasmid of approximately 100 kb (arrows); 798F also harbored a plasmid of approximately 130 kb (arrowhead). The isolate 997F harbors a plasmid of ~ 60 kb.

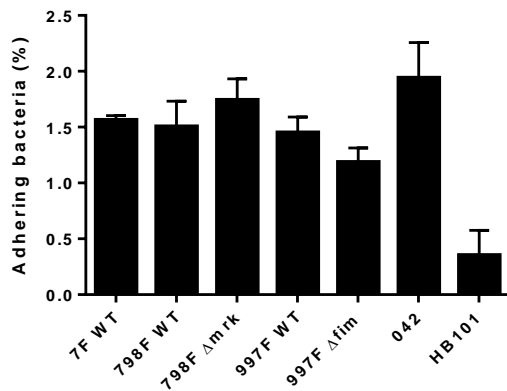


FIGURE 3. Cells adherence of *E. hormaechei* subsp. *oharae* isolates to bladder cells. The bladder epithelial cells (ATCC 5637) monolayers were infected with 7F, 798F, 798F Δmrk , 997F, 997F Δfim , EAEC strain 042 (positive control) or *E. coli* strain HB101 (negative control). The number of cell-adhering bacteria was quantified 3 h later the infection. The data represent numbers of cell-associated bacteria relative to the total numbers of bacteria recovered. Results are presented as the means + standard errors of the means for at least triplicate samples.

V- DISCUSSÃO GERAL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

O surgimento de cepas de enterobactérias “intratáveis” constitui em um problema global e marca o início da era pós-antibiótico (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013; ZOWAWI *et al.*, 2015). A emergência de cepas bacterianas multirresistentes é consequência de mutações dos micro-organismos e da pressão seletiva decorrente do uso de antibacterianos (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013).

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

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

VI - CONCLUSÕES

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

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

VII - REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, p. 623-33, 2010.
- FRONZES, R.; REMAUT, H.; WAKSMAN, G. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. **EMBO J**, v. 27, p. 2271-80, 2008.
- GIRARD, V.; MOUREZ, M. Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: structural and functional features. **Res Microbiol**, v. 157, p. 407-16, 2006.
- GLAVIS-BLOOM, J.; MUHAMMED, M.; MYLONAKIS, E. Of model hosts and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. **Adv Exp Med Biol**, v. 710, p. 11-7, 2012.
- Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics** Geneva: World Health Organization: WHO Press: 1-7 p. 2017.
- GOTTIG, S.; RIEDEL-CHRIST, S.; SALEH, A.; KEMPF, V. A.; HAMPRECHT, A. Impact of bla_{NDM-1} on fitness and pathogenicity of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 47, p. 430-5, 2016.
- GU, C. T.; LI, C. Y.; YANG, L. J.; HUO, G. C. *Enterobacter xiangfangensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional sourdough, and reclassification of *Enterobacter sacchari* Zhu et al. 2013 as *Kosakonia sacchari* comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 64, p. 2650-6, 2014.
- HARDMAN, A. M.; STEWART, G. S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 74, p. 199-210, 1998.
- HAUSSLER, S.; FUQUA, C. Biofilms 2012: new discoveries and significant wrinkles in a dynamic field. **J Bacteriol**, v. 195, p. 2947-58, 2013.
- HENGGE, R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, p. 263-73, 2009.
- HENGGE, R. The General Stress Response in Gram-Negative Bacteria. In: STORZ, G., HENGGE, R. (Ed.). **Bacterial Stress Responses**. 2. Washington, DC, USA: ASM Press, 2011. cap. 15, p.251–289.
- HOFFMANN, H.; ROGGENKAMP, A. Population genetics of the nomenclotype *Enterobacter cloacae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 5306-18, 2003.
- HOFFMANN, H.; STINDL, S.; LUDWIG, W.; STUMPF, A.; MEHLEN, A.; HEESEMANN, J.; MONGET, D.; SCHLEIFER, K. H.; ROGGENKAMP, A. Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. **Syst Appl Microbiol**, v. 28, p. 196-205, 2005a.
- HOFFMANN, H.; STINDL, S.; LUDWIG, W.; STUMPF, A.; MEHLEN, A.; MONGET, D.; PIERARD, D.; ZIESING, S.; HEESEMANN, J.; ROGGENKAMP, A.; SCHLEIFER, K. H. *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* comb. nov., and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 3297-303, 2005b.
- HOFFMANN, H.; STINDL, S.; STUMPF, A.; MEHLEN, A.; MONGET, D.; HEESEMANN, J.; SCHLEIFER, K. H.; ROGGENKAMP, A. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. **Syst Appl Microbiol**, v. 28, p. 206-12, 2005c.
- HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; MOSER, C.; BASSI, G. L.; COENYE, T.; DONELLI, G.; HALL-STOODLEY, L.; HOLA, V.; IMBERT, C.; KIRKETERP-MOLLER, K.; LEBEAUX, D.; OLIVER, A.; ULLMANN, A. J.; WILLIAMS, C.; BIOFILMS, E. S. G. F.;

- CONSULTING EXTERNAL EXPERT WERNER, Z. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clin Microbiol Infect**, v. 21 Suppl 1, p. S1-25, 2015.
- HORMAECHE, E.; EDWARDS, P. R. A proposed genus *Enterobacter*. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy** v. 10, p. 71-74, 1960.
- HOSPENTHAL, M. K.; COSTA, T. R. D.; WAKSMAN, G. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. **Nat Rev Microbiol**, v. 15, p. 365-379, 2017.
- HUANG, Y. J.; WU, C. C.; CHEN, M. C.; FUNG, C. P.; PENG, H. L. Characterization of the type 3 fimbriae with different MrkD adhesins: possible role of the MrkD containing an RGD motif. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 350, p. 537-42, 2006.
- Identification of Enterobacteriaceae**. UK Standards for Microbiology Investigations. Public Health England: 1-34 p. 2015.
- JAGNOW, J.; CLEGG, S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. **Microbiology**, v. 149, p. 2397-405, 2003.
- KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 73, p. 310-47, 2009.
- KARLOWSKY, J. A.; LOB, S. H.; KAZMIERCZAK, K. M.; BADAL, R. E.; YOUNG, K.; MOTYL, M. R.; SAHM, D. F. *In Vitro* Activity of Imipenem against Carbapenemase-Positive Enterobacteriaceae: SMART Global Surveillance Program 2008-2014. **J Clin Microbiol**, 2017.
- KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiol Rev**, v. 28, p. 101-12, 2004.
- KISIELA, D. I.; CHATTOPADHYAY, S.; TCHESNOKOVA, V.; PAUL, S.; WEISSMAN, S. J.; MEDENICA, I.; CLEGG, S.; SOKURENKO, E. V. Evolutionary analysis points to divergent physiological roles of type 1 fimbriae in *Salmonella* and *Escherichia coli*. **MBio**, v. 4, 2013.
- KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. Type 1 Fimbriae, Curli, and Antigen 43: Adhesion, Colonization, and Biofilm Formation. **EcoSal Plus**, v. 1, 2004.
- KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial adhesins: function and structure. **Int J Med Microbiol**, v. 290, p. 27-35, 2000.
- KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, p. 2567-72, 2005.
- KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, p. a010306, 2013.
- KREMER, A.; HOFFMANN, H. Prevalences of the *Enterobacter cloacae* complex and its phylogenetic derivatives in the nosocomial environment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, p. 2951-5, 2012a.
- KREMER, A. N.; HOFFMANN, H. Subtractive hybridization yields a silver resistance determinant unique to nosocomial pathogens in the *Enterobacter cloacae* complex. **J Clin Microbiol**, v. 50, p. 3249-57, 2012b.
- KROGFELT, K. A.; BERGMANS, H.; KLEMM, P. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. **Infect Immun**, v. 58, p. 1995-8, 1990.
- LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, A. K.; WERTHEIM, H. F.; SUMPRADIT, N.; VLIEGHE, E.; HARA, G. L.; GOULD, I. M.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.; SO, A. D.; BIGDELI, M.; TOMSON, G.; WOODHOUSE, W.; OMBAKA, E.; PERALTA, A. Q.; QAMAR, F. N.; MIR, F.; KARIUKI, S.; BHUTTA, Z. A.; COATES, A.;

- BERGSTROM, R.; WRIGHT, G. D.; BROWN, E. D.; CARS, O. Antibiotic resistance-the need for global solutions. **Lancet Infect Dis**, v. 13, p. 1057-98, 2013.
- LEE, C. S.; DOI, Y. Therapy of Infections due to Carbapenem-Resistant Gram-Negative Pathogens. **Infect Chemother**, v. 46, p. 149-64, 2014.
- LEWIS, K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 322, p. 107-31, 2008.
- LIN, C. T.; LIN, T. H.; WU, C. C.; WAN, L.; HUANG, C. F.; PENG, H. L. CRP-Cyclic AMP Regulates the Expression of Type 3 Fimbriae via Cyclic di-GMP in *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS One**, v. 11, p. e0162884, 2016.
- LUTHJE, F. L.; HASMAN, H.; AARESTRUP, F. M.; ALWATHNANI, H. A.; RENSING, C. Genome Sequences of Two Copper-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Copper-Fed Pigs. **Genome Announc**, v. 2, 2014.
- LUTHJE, P.; BRAUNER, A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. **Adv Microb Physiol**, v. 65, p. 337-72, 2014.
- MADSEN, J. S.; RIBER, L.; KOT, W.; BASFELD, A.; BURMOLLE, M.; HANSEN, L. H.; SORENSEN, S. J. Type 3 Fimbriae Encoded on Plasmids Are Expressed from a Unique Promoter without Affecting Host Motility, Facilitating an Exceptional Phenotype That Enhances Conjugal Plasmid Transfer. **PLoS One**, v. 11, p. e0162390, 2016.
- MCBAIN, A. J. Chapter 4 *In Vitro* Biofilm Models. **Advances in Applied Microbiology**, v. 69, p. 99-132, 2009.
- MEIER-KOLTHOFF, J. P.; AUCH, A. F.; KLENK, H. P.; GOKER, M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**, v. 14, p. 60, 2013.
- MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; STEFANI, S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. **Future Microbiol**, v. 7, p. 887-902, 2012.
- MORRILL, H. J.; POGUE, J. M.; KAYE, K. S.; LAPLANTE, K. L. Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. **Open Forum Infect Dis**, v. 2, p. ofv050, 2015.
- NORDMANN, P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. **Med Mal Infect**, v. 44, p. 51-6, 2014.
- NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infect Dis**, v. 9, p. 228-36, 2009.
- NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerg Infect Dis**, v. 17, p. 1791-8, 2011a.
- NORDMANN, P.; POIREL, L.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? **J Antimicrob Chemother**, v. 66, p. 689-92, 2011b.
- NORDMANN, P.; POIREL, L.; WALSH, T. R.; LIVERMORE, D. M. The emerging NDM carbapenemases. **Trends Microbiol**, v. 19, p. 588-95, 2011c.
- O'HARA, C. M.; STEIGERWALT, A. G.; HILL, B. C.; FARMER, J. J., 3RD; FANNING, G. R.; BRENNER, D. J. *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family Enterobacteriaceae formerly known as enteric group 75. **J Clin Microbiol**, v. 27, p. 2046-9, 1989.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu Rev Microbiol**, v. 54, p. 49-79, 2000.

- OHAD, S.; BLOCK, C.; KRAVITZ, V.; FARBER, A.; PILO, S.; BREUER, R.; RORMAN, E. Rapid identification of *Enterobacter hormaechei* and *Enterobacter cloacae* genetic cluster III. **J Appl Microbiol**, v. 116, p. 1315-21, 2014.
- PAAUW, A.; CASPERS, M. P.; LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A.; SCHUREN, F. H.; MONTIJN, R. C.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. Identification of resistance and virulence factors in an epidemic *Enterobacter hormaechei* outbreak strain. **Microbiology**, v. 155, p. 1478-88, 2009.
- PAAUW, A.; CASPERS, M. P.; SCHUREN, F. H.; LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A.; DELETOILE, A.; MONTIJN, R. C.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. **PLoS One**, v. 3, p. e3018, 2008.
- PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **N Engl J Med**, v. 362, p. 1804-13, 2010.
- PROBERT, W. S.; MCQUAID, C.; SCHRADER, K. Isolation and identification of an *Enterobacter cloacae* strain producing a novel subtype of Shiga toxin type 1. **J Clin Microbiol**, v. 52, p. 2346-51, 2014.
- RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. **J Vis Exp**, p. e4392, 2012.
- RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, p. 117-28, 2010.
- REMAUT, H.; TANG, C.; HENDERSON, N. S.; PINKNER, J. S.; WANG, T.; HULTGREN, S. J.; THANASSI, D. G.; WAKSMAN, G.; LI, H. Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. **Cell**, v. 133, p. 640-52, 2008.
- RICHTER, A. M.; POVOLOTSKY, T. L.; WIELER, L. H.; HENGGE, R. Cyclic-di-GMP signalling and biofilm-related properties of the Shiga toxin-producing 2011 German outbreak *Escherichia coli* O104:H4. **EMBO Mol Med**, v. 6, p. 1622-37, 2014.
- ROMLING, U.; KJELLEBERG, S.; NORMARK, S.; NYMAN, L.; UHLIN, B. E.; AKERLUND, B. Microbial biofilm formation: a need to act. **J Intern Med**, v. 276, p. 98-110, 2014.
- ROWE, M. C.; WITHERS, H. L.; SWIFT, S. Uropathogenic *Escherichia coli* forms biofilm aggregates under iron restriction that disperse upon the supply of iron. **FEMS Microbiol Lett**, v. 307, p. 102-9, 2010.
- ROZALES, F. P.; RIBEIRO, V. B.; MAGAGNIN, C. M.; PAGANO, M.; LUTZ, L.; FALCI, D. R.; MACHADO, A.; BARTH, A. L.; ZAVASCKI, A. P. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. **Int J Infect Dis**, v. 25, p. 79-81, 2014.
- SANDERS, W. E., JR.; SANDERS, C. C. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, p. 220-41, 1997.
- SAUER, F. G.; REMAUT, H.; HULTGREN, S. J.; WAKSMAN, G. Fiber assembly by the chaperone-usher pathway. **Biochim Biophys Acta**, v. 1694, p. 259-67, 2004.
- SCHAUFLE, K.; SEMMLER, T.; PICKARD, D. J.; DE TORO, M.; DE LA CRUZ, F.; WIELER, L. H.; EWERS, C.; GUENTHER, S. Carriage of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Plasmids Does Not Reduce Fitness but Enhances Virulence in Some Strains of Pandemic *E. coli* Lineages. **Front Microbiol**, v. 7, p. 336, 2016.
- SCHEMBRI, M. A.; GIVSKOV, M.; KLEMM, P. An attractive surface: gram-negative bacterial biofilms. **Sci STKE**, v. 2002, p. re6, 2002.
- SCHEMBRI, M. A.; KJAERGAARD, K.; KLEMM, P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Mol Microbiol**, v. 48, p. 253-67, 2003.
- SEBGHATI, T. A.; KORHONEN, T. K.; HORNICK, D. B.; CLEGG, S. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. **Infect Immun**, v. 66, p. 2887-94, 1998.

- SERRA, D. O.; HENGGE, R. Stress responses go three dimensional - the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. **Environ Microbiol**, v. 16, p. 1455-71, 2014.
- SERRA, D. O.; RICHTER, A. M.; KLAUCK, G.; MIKA, F.; HENGGE, R. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. **MBio**, v. 4, p. e00103-13, 2013.
- SHAPIRO, J. A. Organization of developing *Escherichia coli* colonies viewed by scanning electron microscopy. **J Bacteriol**, v. 169, p. 142-56, 1987.
- SIEVERT, D. M.; RICKS, P.; EDWARDS, J. R.; SCHNEIDER, A.; PATEL, J.; SRINIVASAN, A.; KALLEN, A.; LIMBAGO, B.; FRIDKIN, S.; NATIONAL HEALTHCARE SAFETY NETWORK, T.; PARTICIPATING, N. F. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 34, p. 1-14, 2013.
- STAHLHUT, S. G.; CHATTOPADHYAY, S.; KISIELA, D. I.; HVIDTFELDT, K.; CLEGG, S.; STRUVE, C.; SOKURENKO, E. V.; KROGFELT, K. A. Structural and population characterization of MrkD, the adhesive subunit of type 3 fimbriae. **J Bacteriol**, v. 195, p. 5602-13, 2013.
- STAHLHUT, S. G.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A. *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbriae agglutinate yeast in a mannose-resistant manner. **J Med Microbiol**, v. 61, p. 317-22, 2012.
- STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, p. 135-8, 2001.
- STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, p. 199-210, 2008.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual review of microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.
- TANGDEN, T.; HICKMAN, R. A.; FORSBERG, P.; LAGERBACK, P.; GISKE, C. G.; CARLS, O. Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by *in vitro* time-kill experiments. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, p. 1757-62, 2014.
- THANASSI, D. G.; BLISKA, J. B.; CHRISTIE, P. J. Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, p. 1046-82, 2012.
- TSAI, C. J.; LOH, J. M.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, p. 214-29, 2016.
- VLAMAKIS, H.; CHAI, Y.; BEAUREGARD, P.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, p. 157-68, 2013.
- WALSH, T. R. Emerging carbapenemases: a global perspective. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36 Suppl 3, p. S8-14, 2010.
- WILLIAMS, P.; WINZER, K.; CHAN, W. C.; CAMARA, M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 362, p. 1119-34, 2007.
- WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Sci**, 2016.
- WOLCOTT, R. D.; RHOADS, D. D.; BENNETT, M. E.; WOLCOTT, B. M.; GOGOKHIA, L.; COSTERTON, J. W.; DOWD, S. E. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. **J Wound Care**, v. 19, p. 45-6, 48-50, 52-3, 2010.

- YAMAMOTO, M.; POP-VICAS, A. E. Treatment for infections with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: what options do we still have? **Crit Care**, v. 18, p. 229, 2014.
- YANG, H.; LV, N.; HU, L.; LIU, Y.; CHENG, J.; YE, Y.; LI, J. *In vivo* activity of vancomycin combined with colistin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a *Galleria mellonella* model. **Infect Dis (Lond)**, v. 48, p. 189-94, 2016.
- YONG, D.; TOLEMAN, M. A.; GISKE, C. G.; CHO, H. S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T. R. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, p. 5046-54, 2009.
- ZHU, B.; LOU, M. M.; XIE, G. L.; WANG, G. F.; ZHOU, Q.; WANG, F.; FANG, Y.; SU, T.; LI, B.; DUAN, Y. P. *Enterobacter mori* sp. nov., associated with bacterial wilt on *Morus alba* L. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 61, p. 2769-74, 2011.
- ZOGAJ, X.; BOKRANZ, W.; NIMTZ, M.; ROMLING, U. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. **Infect Immun**, v. 71, p. 4151-8, 2003.
- ZOWAWI, H. M.; FORDE, B. M.; ALFARESI, M.; ALZAROUNI, A.; FARAHAT, Y.; CHONG, T. M.; YIN, W. F.; CHAN, K. G.; LI, J.; SCHEMBRI, M. A.; BEATSON, S. A.; PATERSON, D. L. Stepwise evolution of pandrug-resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Sci Rep**, v. 5, p. 15082, 2015.