

Caracterização de amostra de *Enterobacter aerogenes* proveniente de colonização quanto aos sistemas CRISPR-Cas e comparação com amostra de infecção

Characterization of the *Enterobacter aerogenes* sample from colonization regarding CRISPR-Cas systems and comparison with infection sample

Caracterización de muestra de *Enterobacter aerogenes* procedente de colonización con sistemas CRISPR-Cas y comparación con muestra de infección

Recebido: 13/04/2023 | Revisado: 29/04/2023 | Aceitado: 02/05/2023 | Publicado: 06/05/2023

Bruna Nunes da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4464-4740>
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Brasil
E-mail: brunanunes.e3@gmail.com

Everton Gomes Damasceno

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-3429-390X>
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Brasil
E-mail: evertongomesdamasceno@gmail.com

Jefferson Cavalcante de Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5494-0570>
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Brasil
E-mail: jeffersoncmed@gmail.com

Matheus dos Santos do Nascimento Carvalho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4907-1750>
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Brasil
E-mail: matheus2029mpc@gmail.com

Maria Clara Lira Guimarães

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8414-8234>
Centro Universitário CESMAC, Brasil
E-mail: claralira.m@gmail.com

Antônio Mauro Rezende

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4775-1779>
Fundação Oswaldo Cruz, Brasil
E-mail: antonio.rezende@fiocruz.br

Thiago José Matos Rocha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5153-6583>
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Brasil
Centro Universitário Cesmac, Brasil
E-mail: thiago.matos@uncisal.edu.br

Juliane Cabral Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3098-1885>
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Brasil
Centro Universitário Cesmac, Brasil
E-mail: juliane.cabral@uncisal.edu.br

Ana Catarina Souza Lopes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0277-108X>
Universidade federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: ana.lopes.ufpe@gmail.com

Adriane Borges Cabral

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4417-7559>
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Brasil
E-mail: adriane.cabral@uncisal.edu.br

Resumo

Enterobacter aerogenes representa uma bactéria gram negativa anaeróbia facultativa, não formadora de esporos. Apresenta-se como um microrganismo multirresistente que está diretamente relacionado a infecções oportunistas, sobretudo em ambiente hospitalar. Essa bactéria dispõe de diversos mecanismos para que se mantenha ativa, podemos destacar dentre estes, a utilização do sistema CRISPR-Cas para imunizá-las da infecção por elementos genéticos móveis. O sistema CRISPR (repetições palindrômicas curtas com intervalos regulares em cluster) trata-se de uma ferramenta genética responsável por clivar a fita dupla de DNA, em loci específicos através de endonucleases Cas.

Diante do exposto o presente estudo teve como objetivo caracterizar amostra de *Enterobacter aerogenes* proveniente de colonização quanto aos sistemas CRISPR-Cas e comparar com amostra de infecção. Ao analisar o isolado de Colonização (Ea5A) foram identificados 31 genes que tinham relação com o sistema CRISPR, dentre esses, apenas 4 tinham associação com as endonucleases Cas, foram verificados inúmeros espaçadores na amostra. Ademais, a comparação entre o isolado de colonização e infecção, propôs que os genes independem da fonte de isolamento bacteriano. O sistema CRISPR-Cas trata-se de um assunto novo, porém já é considerado uma importante ferramenta para a engenharia genética.

Palavras-chave: Edição de genes; Enterobactérias; Repetições palindrômicas.

Abstract

Enterobacter aerogenes represents a non-spore-forming, facultative anaerobic, gram-negative bacterium. It presents itself as a multiresistant microorganism that is directly related to opportunistic infections, especially in the hospital environment. This bacterium has several mechanisms to remain active, we can highlight among these, the use of the CRISPR-Cas system to immunize them from infection by mobile genetic elements. The CRISPR system (short palindromic repeats at regular intervals in cluster) is a genetic tool responsible for cleaving the double strand of DNA at specific loci through Cas endonucleases. In view of the above, the present study aimed to characterize a sample of *Enterobacter aerogenes* from colonization regarding the CRISPR-Cas systems and compare it with a sample of infection. When analyzing the Colonization isolate (Ea5A), 31 genes were identified that were related to the CRISPR system, among these, only 4 were associated with Cas endonucleases, numerous spacers were found in the sample. Furthermore, the comparison between the colonization and infection isolates proposed that the genes are independent of the source of bacterial isolation. The CRISPR-Cas system is a new subject, but it is already considered an important tool for genetic engineering.

Keywords: Gene editing; Enterobacteriaceae; Palindromic repetitions.

Resumen

Enterobacter aerogenes representa una bacteria gramnegativa, anaeróbica facultativa, que no forma esporas. Se presenta como un microorganismo multirresistente que está directamente relacionado con las infecciones oportunistas, especialmente en el ámbito hospitalario. Esta bacteria tiene varios mecanismos para mantenerse activa, entre estos podemos destacar el uso del sistema CRISPR-Cas para inmunizarlos de la infección por elementos genéticos móviles. El sistema CRISPR (repeticiones palindrômicas cortas a intervalos regulares en grupo) es una herramienta genética responsable de escindir la doble hebra de DNA en loci específicos a través de endonucleasas Cas. En vista de lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo caracterizar una muestra de *Enterobacter aerogenes* de colonización con respecto a los sistemas CRISPR-Cas y compararla con una muestra de infección. Al analizar el aislado de Colonización (Ea5A), se identificaron 31 genes que estaban relacionados con el sistema CRISPR, entre estos, solo 4 estaban asociados a endonucleasas Cas, se encontraron numerosos espaciadores en la muestra. Además, la comparación entre los aislamientos de colonización e infección propuso que los genes son independientes de la fuente de aislamiento bacteriano. El sistema CRISPR-Cas es un tema nuevo, pero ya se considera una herramienta importante para la ingeniería genética.

Palabras clave: Edición de genes; Enterobacteriaceae; Repeticiones palindrômicas.

1. Introdução

Enterobacter aerogenes representa uma bactéria gram negativa anaeróbica facultativa, não formadora de esporos. Apresenta-se como um microrganismo multirresistente que está diretamente relacionado a infecções oportunistas, sobretudo em ambiente hospitalar. Sua disseminação está vinculada a diversos mecanismos, como a presença de cascatas regulatórias que atuam na permeabilidade da membrana, possibilitando assim que ocorra a inativação de antibióticos (Wesevich et al., 2020).

Além destas cascatas, essa bactéria dispõe de outros mecanismos para que se mantenha ativa, podemos destacar dentre esses, a utilização do sistema CRISPR-Cas que se trata de um sistema imune adaptativo que fornece proteção contra elementos genéticos móveis como vírus, bacteriófagos e plasmídeos conjugativos, possibilitando a transferência lateral dos genes para a proteção de populações bacterianas (Gonzales de Aledo et al., 2021). Por outro lado, os sistemas CRISPR-Cas também são móveis (Mortensen et al., 2021).

Diante a lenta taxa de desenvolvimento de novos antimicrobianos, quando comparada à rapidez com que microrganismos adquirem resistência a eles, surgiram novas abordagens contra bactérias patogênicas, com diferentes mecanismos de ação: peptídeos antimicrobianos, nanopartículas metálicas, bacteriófagos e ferramentas de edição de genes

(Gonzales de Aledo et al., 2021). Estes últimos são de grande interesse devido à sua capacidade de clivar, de maneira específica, sequências precisas dentro do genoma bacteriano e inclui ZFNs (Zinc-finger nucleases), TALENs (transcription activator-like effector nucleases), peptide nucleic acids, RNA interference (RNAi), com destaque para CRISPR-Cas, que pode ser 100 vezes mais barato, de fácil manuseio e com eficiência semelhante (Gonzales de Aledo et al., 2021).

O sistema CRISPR (repetições palindrômicas curtas com intervalos regulares em cluster), também nomeado de SRSR (repetição com espaçamento regular curto), DR (repetição direta), DVR (repetições de variante direta), TREP (repetição tandem), LCTR (agrupamentos longos de repetições tandem) e SPIDR (espaçadores intercalados repetições diretas), trata-se de uma ferramenta genética responsável por clivar a fita dupla de DNA, em loci específicos através de endonucleases Cas, que podem variar de 4 a mais de 20 em cada loci (Arend et al., 2017).

A estrutura genética do CRISPR, quando transcrita permite a formação do RNA transativador (RNA guia) que direciona a enzima Cas a região alvo da quebra, isso possibilita que ambos sejam introduzidos in vitro em locais específicos do genoma, permitindo a correção de mutações ou a inserção de novas (Cong et al., 2013; Arend et al., 2017; Gonzales de Aledo et al., 2021). Dessa forma, esse sistema propicia defesas bacterianas altamente específicas contra elementos oriundos de bacteriófagos, plasmídeo ou DNA cromossômico extracelular (Gonzales de Aledo et al., 2021).

A disseminação do uso da ferramenta CRISPR tem sido verificada em diversos campos da engenharia genômica, em microrganismos procaríotos e eucaríotos, podendo ser utilizada para clivar espécies específicas e modificar ou silenciar genes de resistência a drogas. Dentre os usos de CRISPR-Cas, foi relatada por Hao et al., (2020), a utilização de um novo sistema de cura de plasmídeo mediado por CRISPR-Cas9 (pCasCure) em vários isolados clínicos de Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos. Os resultados mostraram que pCasCure curou efetivamente blaKPC, blaNDM e blaOXA-48 em várias espécies de Enterobacteriaceae com mais de 94% de eficiência.

A outra vertente de possíveis usos para o sistema CRISPR consiste em ser uma estratégia capaz de imunizar bactérias contra infecções por bacteriófagos, dessa forma pode contribuir para a sobrevivência de importantes bactérias utilizadas nas mais diversas áreas frente aos bacteriófagos mais comuns. Como por exemplo, a utilização de CRISPR-Cas para imunizar *Streptococcus thermophilus* utilizadas na indústria de laticínios, além de produção de queijos e iogurtes (Barrangou & Horvath, 2012). CRISPR são responsáveis pela defesa da bactéria contra uma futura infecção por esse mesmo bacteriófago (Jinek et al., 2012).

Diante do exposto o presente estudo tem como objetivo caracterizar amostra de *Enterobacter aerogenes* proveniente de colonização quanto aos sistemas CRISPR-Cas e comparar com amostra de infecção. A utilização dos genes CRISPR-Cas como ferramenta de tipagem permitirá um maior conhecimento sobre CRISPR-Cas presentes em *E. aerogenes*, além de, confrontar os resultados encontrados com a origem do isolado bacteriano.

2. Metodologia

Genomas dos Isolados bacterianos

Os genomas que foram utilizados no presente estudo foram obtidos a partir de isolados de *E. aerogenes* provenientes de colonização (Ea5A) e infecção (Ea7A) da Unidade de Tratamento Intensivo de um Hospital público de Recife-PE submetidos a sequenciamento genômico, montados, preditos e anotados utilizando diversas ferramentas gratuitas (Cabral, 2016). Os genomas estão depositados sob códigos de acesso: SRP131863 (SRA); PRJNA310664 (Bioproject), SAMN04461808 e SAMN04461809 (Biosample).

Análise manual e acurada para identificação dos genes relacionados a bacteriófagos

A identificação dos genes CRISPR-Cas foi realizada através de análise manual e acurada de todos os genes anotados para cada isolado. Para isso foram utilizados o banco de dados MySQL (<https://www.mysql.com/>) e ferramentas de leitura/edição de planilhas (Microsoft Office excel) com o objetivo de identificar os genes CRISPR-Cas. Também foram consultados bancos de dados públicos (genebank, uniprot, expasy, dentre outros) e artigos científicos para confirmar a identificação dos genes CRISPR-Cas (Silva et al., 2022).

3. Resultados e Discussão

O genoma relacionado ao isolado *E. aerogenes* proveniente de colonização (Ea5A) apresentou 5844 genes cromossômicos e 438 genes plasmidiais. Foram analisados manualmente todos os genes anteriormente mencionados, sendo detectados 31 genes cromossômicos relacionados à função CRISPR, como observado na tabela 1, e nenhum gene que tivesse relação com CRISPR no DNA plasmidial.

Tabela 1 - Caracterização descritiva sobre os genes CRISPR RELACIONADO AS ENDONUCLEASES CAS, em isolado de *E. aerogenes* provenientes de colonização (Ea5A).

<u>GENE</u>	<u>LOCALIZAÇÃO^(A)</u>	<u>COMPRIMENTO EM pb^(B)</u>
“CRISPR-associated protein, Cas2”	“NODE_283_length_292898_cov_77.6824_42_25778-240”	239 pb
“CRISPR-associated protein Cas1”	“NODE_283_length_292898_cov_77.6824_42_26679-876”	875 pb
“CRISPR-associated protein, Cse3 family”	“NODE_283_length_292898_cov_77.6824_42_27395-717”	716 pb
“CRISPR-associated protein, Cse4 family”	“NODE_283_length_292898_cov_77.6824_42_28442-1035”	1034 pb
“CRISPR-associated protein, Cse3 family”	NODE_283_length_292898_cov_77.68244_2_29116-645	644 pb
“CRISPR-associated protein, Cse2 family”	“NODE_283_length_292898_cov_77.6824_42_29675-567”	566 pb
“CRISPR-associated protein, Cse1 family”	NODE_283_length_292898_cov_77.68244_2_31210-1524	1523 pb
“CRISPR-associated helicase Cas3”	“NODE_283_length_292898_cov_77.6824_42_33610-2397”	2396 pb
“CRISPR-associated helicase Cas3”	“NODE_285_length_86098_cov_80.88907_6_72602-276”	275 pb

(A) Localização do gene no genoma; (B) Tamanho dos genes em pares de base (pb). Fonte: Dados da pesquisa.

Mortensen et al. (2021), analisando a presença de CRISPR no grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Clostridium difficile*), identificaram um espectro muito amplo da presença de CRISPR-Cas nesses patógenos, onde *S. aureus* apresentou a menor tendência de obter os sistemas CRISPR-Cas com apenas 0,55% de seus isolados, enquanto todos os isolados de *C. difficile* apresentaram vários sistemas CRISPR-Cas.

A ausência de CRISPR no DNA plasmidial pode ser explicada devido o fato de após a infecção celular por um bacteriófago, o sistema cliva as regiões próximas aos proto-espaçadores e o DNA plasmidial, impossibilitando a adesão do CRISPR-Cas (Garneau et al., 2011).

Consoante a isso, um estudo realizado com 2282 plasmídeos de uma espécie bacteriana identificou a presença de espaçadores em seu DNA, no entanto, diferente do DNA cromossômico, os mesmos eram incompatíveis com a atividade desenvolvida por CRISPR. Tais padrões de distribuição sugeriram que a presença de CRISPRs tem pouco efeito sobre a epidemiologia dos plasmídeos (Touchon, 2012).

Dentre os genes CRISPR observados no DNA cromossômico, quatro tiveram associação direta com as endonucleases Cas (Cas1, Cas2 e duas Cas3), cinco estiveram relacionados com determinado subtipo de Cas *Escherichia* (Cse), no entanto, houve a predominância de CRISPR spacer e de genes, os quais estavam interligados a CRISPR com repetição de sequências nucleotídicas específicas (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização descritiva sobre os genes CRISPR-CAS RELACIONADO AS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS em isolado de *E. aerogenes* provenientes de colonização (Ea5A).

<u>FUNÇÃO</u>	<u>LOCALIZAÇÃO^(A)</u>	<u>COMPRIMENTO EM pb^(B)</u>
CRISPR repeat with sequence ttaaaccctacgtgcgtggggaagat	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442_24853+28”	638 pb
CRISPR repeat with sequence gaaacacccccacgtgcgtggggaagac	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442_24914+28”	27 pb
CRISPR repeat with sequence gaaacacccccacgtgcgtggggaagac	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442_24976+28”	27 pb
CRISPR repeat with sequence gaaacacccccacgtgcgtggggaagac	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442_25037+28”	27 pb
CRISPR repeat with sequence gaaacacccccacgtgcgtggggaagac	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442_25098+28”	27 pb
CRISPR repeat with sequence gaaacacccccacgtgcgtggggaagac	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442_25159+28”	27 pb
CRISPR repeat with sequence gaaacacccccacgtgcgtggggaagac	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442_25220+28”	27 pb
CRISPR repeat with sequence gaaacacccccacgtgcgtggggaagac	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442_25281+28”	27 pb
CRISPR repeat with sequence gaaacacccccacgtgcgtggggaagac	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442_25342+28”	27 pb
CRISPR repeat with sequence gaaacacccccacgtgcgtggggaagac	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442_25403+28”	27 pb
CRISPR repeat with sequence gaaacacccccacgtgtggggaagac	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442_25464+28”	27 pb

(A) Localização do gene no genoma; (B) Tamanho dos genes em pares de base (pb). Fonte: Dados da pesquisa.

Ao investigar a presença de outros microrganismos com a presença de CRISPR com a repetição da sequência gaaacacccccacgtgcgtggggaagac, na base de dados do NCBI (nucleotide), foram encontrados 598 genes que tiveram relação, dos quais apenas 7 eram provenientes de cepas de *Klebsiella aerogenes* (*E. aerogenes*). A detecção em outros gêneros bacterianos deve-se ao fato de que o sistema CRISPR é difundido em procariotos e são encontrados na maioria das espécies

Archaea e cerca de metade das espécies bacterianas (Zhang & Yuzhen, 2017; Mortensen et al., 2021). Já a repetição da sequência ttaacaccctacgtgcgtggggaagat, conforme investigado na mesma base de dados, não apresentou nenhum microrganismo correspondente.

A presença observada de proteínas Cas nos genes é de grande importância pois prever o funcionamento adequado do sistema CRISPR, a incorporação de novas seqüências de espaçadores, biogênese de RNAs CRISPR (crRNAs) e a degradação de ácidos nucleicos invasores.

Além dessas seqüências, o isolado de *E. aerogenes* apresentou inúmeros genes CRISPR com a presença de espaçadores, conforme verificado na tabela a seguir.

Tabela 3- Caracterização descritiva sobre os genes CRISPR RELACIONADOS À ESPAÇADORES em isolado de *E. aerogenes* provenientes de colonização (Ea5A).

<u>FUNÇÃO</u>	<u>LOCALIZAÇÃO^(A)</u>	<u>COMPRIMENTO EM pb^(B)</u>
“CRISPR spacer”	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442”	32 pb
“CRISPR spacer”	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442”	33 pb
“CRISPR spacer”	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442”	32 pb
“CRISPR spacer”	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442”	32 pb
“CRISPR spacer”	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442”	32 pb
“CRISPR spacer”	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442”	32 pb
“CRISPR spacer”	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442”	32 pb
“CRISPR spacer”	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442”	32 pb
“CRISPR spacer”	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442”	32 pb
“CRISPR spacer”	“NODE_283_length_292898_cov_77.682442”	32 pb

(A) Localização do gene no genoma; (B) Tamanho dos genes em pares de base (pb). Fonte: Dados da pesquisa.

Segundo Medina et al. (2018), a resistência aumenta conforme o número de espaçadores, já que os mesmos correspondem a genomas de bacteriófagos e outros elementos genéticos móveis, que ao serem incorporados ao sítio do hospedeiro permitem a produção de memória molecular desenvolvida para uma infecção prévia. É possível inferir então que a amostra de *E. aerogenes* apresenta relativa resistência bacteriana aos bacteriófagos, pois a maior parte dos genes verificados com CRISPR possui a presença de espaçadores. Tal aquisição ocorre mediante presença de cas1 e cas2, os quais também foram encontrados no isolado (Jiang et al., 2013; Nunez et al., 2014; Shipman et al., 2016). Embora tenham sido encontrados inúmeros CRISPR associados a espaçadores, os quais estavam na mesma localização genética, os mesmos constituíram-se de seqüências nucleotídicas distintas (Tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização descritiva da sequência nucleotídica observada nos espaçadores encontrados no isolado de *E. aerogenes* provenientes de colonização (Ea5A).

<u>ESPACADORES</u>	<u>SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA</u>
“CRISPR spacer”	cgctctatcgccacgcgcagtcagcgcggtag
“CRISPR spacer”	cccactgggtaccgtgaccgcccggcgcaataaa
“CRISPR spacer”	ggacgaccgctggcacctggcctgccggggcga
“CRISPR spacer”	gcatactaccctcagcagattccagggcttg
“CRISPR spacer”	cagtaccgaaaaagcagaacttaaccaccaa
“CRISPR spacer”	ttttattggttcatcatcatgtgattaattga
“CRISPR spacer”	cctcaaaaacgcattccgcttgcgctgggtga
“CRISPR spacer”	ttccatcaagcttatcgaccgaaagcatcacca
“CRISPR spacer”	ccagaaggacgcgaaaacgctcaggggtattga
“CRISPR spacer”	ttaattcaactttgaaatgaatgatcgttttg

Fonte: Dados da pesquisa.

Tal achado, corrobora com estudo realizado com *Klebsiella pneumoniae*, que propôs que entre os genes que continham espaçadores no DNA bacteriano, nenhum era idêntico, indicando a especificidade do sistema CRISPR-Cas (Shen et al., 2017).

Sobre o comprimento das sequências nucleotídicas, as menores (com 27 bases) também foram verificadas por Lammoglia-Cobo et al. (2016), que observaram sequências com espaçamento de 25 a 50 nucleotídeos intercalados por elementos repetidos, tais elementos são justificados devido ao fato de que no processo após a exposição ao patógeno é necessário a aquisição de espaçadores, os quais, são incorporados para facilitar a adesão ao CRISPR no novo fragmento.

Vale ressaltar que Cas1 e Cas2 são as proteínas Cas necessárias para o registro genético de infecções através da aquisição de espaçadores de DNA invasor, conferindo um mecanismo de geração de memória em todos os sistemas CRISPR-Cas (Shmakov, 2015; Xue & Sashital, 2019). Não obstante, as proteínas Cas podem ser visualizadas com nomes alternativos (Tabela 5), dentre as proteínas presentes no CRISPR de classe 1 mencionadas por Xue & Sashital (2019), apenas Cas5 não foi observada nesta pesquisa.

Tabela 5 - Classes I-Y e I-F das proteínas Cas.

<u>NOME</u>	<u>CLASSE I-Y</u>	<u>CLASSE I-F</u>
Cas 1	Cas 1	Cas 1
Cas 2	Cas 2	Cas 2/Cas 3
Cas 3	Cas 3	Cas 2/Cas 3
Cas 5	CasD/Cas 5	Cas 5/ Csy 2
Cas 6	Cas E/ Cas 6/ Cse 3	Cas6f/ Csy 4
Cas 7	Cas 7/ Cse 4/Cas C	Cas 7/ Csy 3
Cas 8	Cas 8 e/Cse 1	Cas 8f/ Csy 1
Cas 11	Cas 11/Cse 2/Cas B	-

Fonte: Tabela baseada no estudo de Xue e Sashital (2019).

Em relação à análise comparativa entre os isolados de *E. aerogenes* provenientes de colonização (Ea5A) e infecção (Ea7A) da Unidade de Tratamento Intensivo de um Hospital público de Recife foi verificado que ambos os isolados apresentaram os mesmos 31 genes relacionados a CRISPR-Cas no DNA cromossômico, evidenciando que os genes independem da fonte de isolamento bacteriano.

4. Conclusão

O sistema CRISPR-Cas trata-se de um assunto novo, porém já é considerado uma importante ferramenta para a engenharia genética. Sua presença é observada em diversos microrganismos procariotos, o isolado de *Enterobacter aerogenes* analisado apresentou inúmeros genes relacionados com o sistema CRISPR-Cas, além disso, a presença de espaçadores prevê a potencial resistência bacteriana apresentada pela mesma a elementos estranhos.

Ademais, a comparação entre o isolado de colonização e infecção, propôs que os genes independem da origem do isolado bacteriano, porém novos estudos devem ser realizados com outras espécies e fontes de isolamento visando contribuir para o conhecimento sobre CRISPR-Cas em diferentes isolados clínicos.

Referências

- Arend, M. C., Pereira, J. O., & Markoski, M. M. (2017). The CRISPR/Cas9 System and the Possibility of Genomic Edition for Cardiology. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 108(1), 81–83. <https://doi.org/10.5935/abc.20160200>
- Barrangou, R., & Horvath, P. (2012). CRISPR: New Horizons in Phage Resistance and Strain Identification. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 143-162.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 15, 339(6121), 819-823. [10.1126/science.1231143](https://doi.org/10.1126/science.1231143).
- Garneau, J. E., Dupuis, M. È., & Villion, M. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 4, 468(7320), 67-71. [10.1038/nature09523](https://doi.org/10.1038/nature09523).
- González de Aledo, M., González-Bardanca, M., Blasco, L., Pacios, O., Bleriot, I., Fernández-García, L., Fernández-Quejo, M., López, M., Bou, G., & Tomás, M. (2021). CRISPR-Cas, a Revolution in the Treatment and Study of ESKAPE Infections: Pre-Clinical Studies. *Antibiotics (Basel)*, 22, 10(7), 756. [10.3390/antibiotics10070756](https://doi.org/10.3390/antibiotics10070756).
- Hao, M., He, Y., Zhang, H., Liao, X. P., Liu, Y. H., Sun, J., Du, H., Kreiswirth, B. N., & Chen, L. (2020). CRISPR-Cas9-Mediated Carbapenemase Gene and Plasmid Curing in Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 20, 64(9), e00843-20. [10.1128/AAC.00843-20](https://doi.org/10.1128/AAC.00843-20).
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., & Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 31(3), 233-239. [10.1038/nbt.2508](https://doi.org/10.1038/nbt.2508).
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 17, 337(6096), 816-821. [10.1126/science.1225829](https://doi.org/10.1126/science.1225829).
- Lammoglia-Cobo, M. F., Lozano-Reyes, R. D., García-Sandoval, C. D., Avilez-Bahena, C. M., Trejo-Reveles, V. T., Muñoz-Soto, R. B., & López-Camacho, C. A. (2016). La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. *Investigación en Discapacidad*, 5(2), 116-128.
- Silva, J. R. M., Bezerra, E. C. S., de Lima, J. C., Carvalho, M. S. N., Rezende, A. M., Rocha, T. J. M., Silva, J. C., Lopes, A. C. S., & Cabral, A. B. (2022). Caracterização de genes relacionados a bacteriófagos em *Enterobacter aerogenes* proveniente de infecção em paciente de hospital de Recife-PE, Brasil. *Research, Society and Development*, 11(12), e481111235004, (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i12.35004>.
- Medina-Aparicio, L., Dávila, S., Rebollar-Flores, J. E., Calva, E., & Hernández-Lucas, I. (2018). The CRISPR-Cas system in Enterobacteriaceae. *Pathogens and disease*, 76(1), [10.1093/femspd/fty002](https://doi.org/10.1093/femspd/fty002). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty002>
- Mortensen, K., Lam, T. J., & Ye, Y. (2021). Comparison of CRISPR-Cas Immune Systems in Healthcare-Related *Pathogens* *Frontiers in Microbiology*, 25(12), 758782. [10.3389/fmicb.2021.758782](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.758782).
- Núñez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V., Davies, C. W., & Doudna, J. A. (2014). Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature structural & molecular biology*, 21(6), 528–534. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2820>
- Shipman, S. L., Nivala, J., Macklis, J. D., & Church, G. M. (2016). Molecular recordings by directed CRISPR spacer acquisition. *Science*, 353 (6298), aaf1175. [10.1126/science.aaf1175](https://doi.org/10.1126/science.aaf1175)
- Shen, J., Lv, L., Wang, X., Xiu, Z., & Chen, G. (2017). Comparative analysis of CRISPR-Cas systems in Klebsiella genomes. *Journal of basic microbiology*, 57(4), 325–336. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600589>

Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., Semenova, E., Minakhin, L., Joung, J., Konermann, S., Severinov, K., Zhang, F., & Koonin, E. V. (2015). Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Molecular cell*, 60(3), 385–397. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.008>

Touchon, M., Charpentier, S., Pognard, D., Picard, B., Arlet, G., Rocha, E. P., Denamur, E., & Branger, C. (2012). Antibiotic resistance plasmids spread among natural isolates of *Escherichia coli* in spite of CRISPR elements. *Microbiology (Reading, England)*, 158(12), 2997–3004. <https://doi.org/10.1099/mic.0.060814-0>

Wesevich, A., Sutton, G., Ruffin, F., Park, L. P., Fouts, D. E., Fowler, V. G., Jr, & Thaden, J. T. (2020). Newly Named *Klebsiella aerogenes* (formerly *Enterobacter aerogenes*) Is Associated with Poor Clinical Outcomes Relative to Other *Enterobacter* Species in Patients with Bloodstream Infection. *Journal of clinical microbiology*, 58(9), e00582-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00582-20>

Xue, C., & Sashital, D. G. (2019). Mechanisms of Type I-E and I-F CRISPR-Cas Systems in *Enterobacteriaceae*. *EcoSal Plus*, 8(2), 10.1128/ecosalplus.ESP-0008-2018. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0008-2018>

Zhang, Q., & Ye, Y. (2017). Not all predicted CRISPR-Cas systems are equal: isolated cas genes and classes of CRISPR like elements. *BMC bioinformatics*, 18(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1512-4>