

Universidade Do Grande Rio “Prof. José De Souza Herdy”
UNIGRANRIO
Pró-Reitora de Pós-Graduação e Pesquisa -PROPEP
Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional - BIOTRANS

Victor Hugo Moreira

**Análise Genômica Comparativa do Perfil Patogênico da cepa *Aeromonas* sp.
V15**

Duque de Caxias

2018

Victor Hugo Moreira

**ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DO PERFIL PATOGÊNICO DA CEPA
*AEROMONAS SP. V15***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional, da Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy como parte dos requisitos parciais para a obtenção do grau de Mestre em Biomedicina Translacional.

**Orientador: Alexander Machado
Cardoso**

Duque de Caxias

Junho de 2018

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional
Mestrado e Doutorado

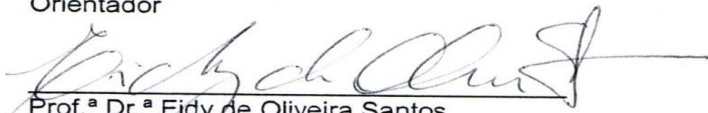


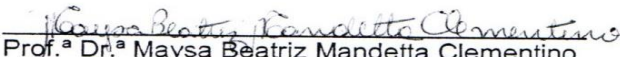
Às dez horas do dia dezoito de junho do ano de 2018, Sala da Pós-Graduação, na Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – UEZO realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado intitulada “Biomarcadores de Interesse Biomédico em Biofilmes Presentes em Reservatórios de Água: Análise Genômica Comparativa do Perfil Patogênico da CEPA *Aeromonas* sp. V15”, de autoria de **Victor Hugo Moreira**, mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional - Biotrans, sob a orientação do Prof. Dr. Alexander Machado Cardoso. A sessão foi aberta pela Prof.^a Dr.^a Eidy de Oliveira Santos, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof. Dr. Maysa Beatriz Mandetta Clementino e Prof.^a Dr.^a Janaina Japiassu Vasconcelos Cavalcante. Em seguida passou a palavra ao candidato para apresentação de sua dissertação. Após apresentação, o candidato foi arguido pelos examinadores, e suas respostas consideradas satisfatórias.

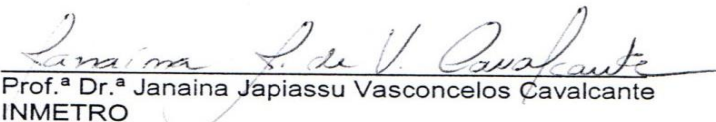
A presidente declarou o mestrando **Victor Hugo Moreira**, APROVADO, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas em acordo com o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – Biotrans. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão, onde foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

Duque de Caxias, 18 de junho de 2018.


Prof. Dr. Alexander Machado Cardoso
UEZO
Orientador


Prof.ª Dr.ª Eidy de Oliveira Santos
UEZO
Presidente


Prof.ª Dr.ª Maysa Beatriz Mandetta Clementino
FIOCRUZ


Prof.ª Dr.ª Janaina Japiassu Vasconcelos Cavalcante
INMETRO


Prof.ª Virginia Genelhu de Abreu
Coordenadora Geral do Programa
Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por tudo que fez, faz e fará na minha vida e por ter me permitido chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais que sempre me apoiaram e são exemplos de vida.

Agradeço de forma especial ao meu orientador Prof. Alexander pela orientação, por não desistir deste trabalho e por sempre incentivar o meu melhor e a minha curiosidade.

Agradeço ao corpo docente do Biotrans pela compreensão, paciência e ao conhecimento dados durante todo o mestrado.

Agradeço aos professores Héctor Romero, Fernando Alvarez-Valín e Marcos Catanho por fornecerem todo conhecimento computacional para a feitura deste trabalho.

Agradeço à FAPERJ pelo apoio financeiro concedido.

“enquanto se ocupavam com os seus múltiplos problemas, os homens eram examinados tão pormenorizadamente como o são, sob a lente do microscópio, as criaturas efémeras que abundam e sem multiplicam numa gota de água.”- H.G. Wells , Guerra dos Mundos

RESUMO

Aeromonas são bactérias do tipo bacilos gram-negativos encontrados em diferentes ambientes aquáticos, inclusive em água potável. Todavia, certas espécies de *Aeromonas* são causadoras de patologias como a gastroenterite, infecção na pele e septicemia. O objetivo deste presente trabalho foi determinar e analisar o genoma da cepa *Aeromonas* sp. V15 isolada de biofilme de reservatório de água potável, bem como realizar análises de genômica comparativa. O genoma da cepa *Aeromonas* sp. V15 foi determinado e anotado, sendo seu conteúdo GC de 61.8% e preditos ao todo 4.337 genes, com 4.028 CDS (regiões codificadoras de proteínas) e 144 genes de RNA estruturais. Foram identificados pelo menos 10 genes que conferem resistência a antibióticos, sendo três genes que conferem resistência aos betas lactâmicos, cinco genes de resistência a antibióticos macrolídeos e dois genes de resistência aos antibióticos quinolonas. Foram detectadas ilhas de genômicas que conferem resistência a multidrogas, capacidade de metabolização de fosfonato e síntese de antígeno O. Em relação aos genes associados a fatores de virulência, foram observados genes envolvidos na adesão, motilidade e na síntese de toxinas, assim como, em sistema de secreção. A presença dos três pili, dos flagelo polar e lateral podem ser um indicativo de que a cepa *Aeromonas* sp. V15 é capaz de formar biofilmes e que provavelmente pode ter utilizado esta via para estar presente na água potável. Os resultados obtidos neste trabalho podem levar ao desenvolvimento de biomarcadores e a uma maior compreensão acerca da evolução, virulência, formação de biofilme e resistência a antibióticos em *Aeromonas* spp.

Palavras-chaves: Anotação genômica; Biofilme; Fatores de virulência; Resistência a antibióticos.

ABSTRACT

Aeromonas are gram-negative bacilli-like bacteria found in different aquatic environments, including drinking water. However, certain species of *Aeromonas* are causing pathologies such as gastroenteritis, skin infection and septicemia. The objective of this work was to determine and analyze the genome of the strain *Aeromonas* sp. V15 isolated from potable water reservoir biofilm, as well as perform comparative genomic analyzes. The genome of the strain *Aeromonas* sp. V15 was determined and annotated, with its GC content of 61.8% and a total of 4,337 genes predicted, with 4,028 CDS (protein coding regions) and 144 structural RNA genes. At least 10 genes conferring resistance to antibiotics have been identified, with three genes conferring beta lactam resistance, five macrolide antibiotic resistance genes and two quinolone antibiotic resistance genes. It was identified genomic island that confer resistance to multi drugs, capacity to metabolize phosphonate and genes involved in synthesis of antigen O. Regarding the genes associated to virulence factors, genes involved in adhesion, motility and toxin synthesis were observed, as well as in secretion. The presence of the three pili, polar and lateral flagellar may be an indication that the strain *Aeromonas* sp. V15 is able to form biofilms and may have probably used this pathway to be present in drinking water. T3SS is considered one of the central factors for virulence in *Aeromonas*. This system of secretion has recently been described in *Aeromonas dhakensis* and in virulent strains, in addition the inactivation of this factor leads to drastic loss of virulence in *Aeromonas hydrophila*. The absence of T3SS was observed in this genome. This virulence factor is also absent in other strains of *Aeromonas caviae* involved in diarrhea and even in outbreaks, which may indicate that it may not be a central factor for virulence in *Aeromonas caviae*. The results obtained in this work can lead to the development of biomarkers and a greater understanding of the evolution, virulence, formation of biofilm and resistance to antibiotics in *Aeromonas* spp.

Keywords: Genomic annotation; Biofilm; Virulence factors; Resistance to antibiotics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Mapa circular do genoma de *Aeromonas sp* V15 obtido pelo GCView, baseado na anotação do RAST. Partindo de dentro para fora, no círculo central as posições ao redor do genoma de *Aeromonas sp* V15, o círculo posterior representa o de GC skew sendo que os valores positivos são representados pela cor rosa e os valores negativos cor verde. O círculo mais externo representa o conteúdo de G + C sendo a linha de base valor médio de 61,7% de conteúdo G+C. O círculo mais exterior são os marcadores de posição no genoma de *Aeromonas sp* V1542
- Figura 2** Distribuição dos de genes preditos em *Aeromonas sp* V15 em subsistemas baseados na anotação do RAST43
- Figura 3** Árvore filogenética baseada a partir de 11 genes *housekeeping*, com os valores de *bootstrap* *Aeromonas sp* V15 é marcada com uma esfera negra.....50
- Figura 4** – Alinhamento pelo Clustal Omêga da beta-lactamsase codificada pelo gene *bla_{oxa-504}* (648.104.peg.2211), de *Aeromonas sp*. V15, da beta-lactamsae codificada pelo gene *bla_{oxa-427}* (ARO85965.1) de *Enterobacter cloacae* e Amps (AHX63134.1) de *Aeromonas media* WS respectivamente. As regiões conservadas são representadas pelo asterisco, os dois pontos indicam a conservação de aminoácidos com propriedades fortemente similares e o ponto indica conservação entre grupos de propriedades fracamente similares52
- Figura 5** - Mapa circular do genoma de *Aeromonas sp* V15 pelo DNA ploter. Partindo de dentro para fora, os dois círculos centrais representam o GC skew e o conteúdo de G + C, respectivamente. A linha de base no gráfico G + C representa o valor médio de 61,8%, sendo que os valores de G+C acima da

média são representados pela cor bege e os valores abaixo são representados pela cor roxa. No círculo seguinte as onze ilhas gênomicas (GI) são representadas pelos pinos de cor preta. No círculo cinza são mostrados os tRNA cor verde. Nos círculos mais externos as ORFs da fita negativa são representadas pela cor verde escuro e as ORFs da fita positiva são representadas pela cor azul claro e o círculo externo preto designa as posições, ao redor do genoma do genoma de *Aeromonas sp* V15.....54

Figura 6 – Organização gênica da ilha genômica 4. Cada seta representa uma ORF, sendo que as setas em direção à direita, representam a fita positiva e as setas para a esquerda representam a fita negativa, abaixo é mostrado o gráfico de conteúdo G+C em percentual para a região onde está localizada a ilha, sendo que a linha preta tracejada mostra o valor de conteúdo G+C de todo o genoma de *Aeromonas sp* V15.55

Figura 7 - Organização gênica da ilha genômica 10. Cada seta representa uma ORF, sendo que as setas em direção à direita, representam a fita positiva e as setas para a esquerda representam a fita negativa, abaixo é mostrado o gráfico de conteúdo G+C em percentual para a região onde está localizada a ilha, sendo que a linha preta tracejada mostra o valor de conteúdo G+C de todo o genoma de *Aeromonas sp* V15.56

Figura 8 Organização gênica da ilha genômica 11. Cada seta representa uma ORF, sendo que as setas em direção à direita, representam a fita positiva e as setas para a esquerda representam a fita negativa, abaixo é mostrado o gráfico de conteúdo G+C em percentual para a região onde está localizada a ilha, sendo que a linha preta tracejada mostra o valor de conteúdo G+C de todo o genoma de *Aeromonas sp* V15.57

Figura 9 - Organização gênica da ilha genômica 5. Cada seta representa uma ORF, assim como a sua localização na fita de DNA, sendo que as setas em direção

à direita, representam a fita positiva e as setas para a esquerda representam a fita negativa.58

Figura 10 - Reação de catabolismo de ácido 2-aminoetilfosfonóico.68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Genomas das cepas do gênero *Aeromonas*, que foram utilizados nas análises de GGDH, ANI e *multilocus*, assim como os respectivos números de acesso destas cepas.35
- Tabela 2** - Genes *housekeeping* utilizados para a reconstrução filogenética39
- Tabela 3** - Os resultados, respectivamente, de DDHs em percentual, da distância genômica (Dist.) e da probabilidade do valor de DDHs ser maior que 70% (DDH>70%) das cepas que utilizadas para a análise de DDHs da **Tabela 1** contra *Aeromonas sp* V15. Os dados estão ordenados dos maiores valores DDHs para os menores valores. Assim como as cepas que obtiveram valores maiores que 70% estão sombreadas.....44
- Tabela 4** - Os resultados, respectivamente, de ANI em percentual e do alinhamento em percentual das cepas utilizadas para a análise de DDHs da **Tabela 1** contra *Aeromonas sp* V15. Os dados estão ordenados dos maiores valores ANI para os menores valores. Assim como as cepas que obtiveram valores maiores que 96% estão sombreadas.47
- Tabela 5** - Genes de resistência de à antibióticos encontrados em *Aeromonas sp* V15, assim como os seus respectivos produtos e *locus tag*.51
- Tabela 6** - Ilhas gênicas encontradas no genoma de *Aeromonas sp* V15, assim como a localização de início e final dessas sequências no genoma de *Aeromonas sp* V15 tamanho, o número de CDS e as classes das ilhas.. 53
- Tabela 7** - Fatores de virulência encontrados no genoma de *Aeromonas sp* V15 e os seus respectivos locustag58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANI	Identidade média de Nucleotídeos
AMPC	Monofosfato Cíclico de Adenosina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLASTn	Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool
BLASTp	<i>Protein Basic Local Alignment Search Tool</i>
CARD	<i>The Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
CDS	Sequências Codificantes
DDHis	Hibridização ácido desoxirribonucleico – ácido desoxirribonucleico <i>in silico</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GGDC	<i>Genome-to-Genome Distance Calculator</i>
GI	Ilha Genômica
GIPSy	<i>Genomic Island Prediction Software</i>
HSPs	<i>High-Scoring Segment Pair</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
MUMmer	<i>Maximal Unique Matches</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDARO	<i>National Database of Antibiotic Resistant Organisms</i>
ORF	Fase de Leitura de Aberta
PATRIC	<i>Pathosystems Resource Integration Center</i>
PHASTER	<i>PHAge Search Tool Enhanced Release</i>
PNUMA	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente

RAST	<i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RefSeq	NCBI <i>Reference Sequence Database</i>
rRna	RNA ribossômico
tRNA	RNA transportador
T2SS	Sistema de secreção tipo II
T3SS	Sistema de secreção tipo III
T6SS	Sistema de secreção tipo VI
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
VFDB	<i>Virulence Factors Database</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Microrganismos emergentes na água potável	18
2.2 Características gerais de <i>Aeromonas</i>	18
2.3 Infecções causadas por <i>Aeromonas</i>	20
2.3.1. Gastroenterite	20
2.3.2. Infecção no tecido mole e feridas.....	22
2.3.3. Septicemia	23
2.3.4 Infecções diversas	24
2.4 Mecanismos de patogenicidade e virulência	24
2.4.1. Adesão e Motilidade	24
2.4.2. Toxinas.....	25
2.4.3. Enzimas	26
2.4.4. Sistema de Secreção.....	26
2.5 Epidemiologia e surtos de <i>Aeromonas</i>	27
2.6 Genômica	28
2.6.1. Banco de dados para genes de virulência e resistência a antibióticos	29
2.6.2. Ilhas genômicas.....	30
2.6.3. Similaridade entre genomas por ANI e DDH's.....	31
2.6.4. <i>Multilocus Sequence Analysis</i> (MLSA).....	31
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo Geral.....	33
3.2. Objetivos Específicos	33
4. METODOLOGIA	34
4.1. Obtenção da amostra.....	34
4.2. Sequenciamento e montagem do genoma	34
4.3. Anotação do genoma	34
4.4. Similaridade de genomas.....	35
4.5. <i>Multilocus Sequence Analysis</i> – MLSA.....	38
4.6. Resistência a antibióticos.....	39
4.7. Presença de ilhas genômicas.....	40

4.8. Virulência.....	41
5. RESULTADOS	42
5.1. Anotação do genoma <i>Aeromonas sp V15</i>	42
5.2. Similaridade dos genomas.....	44
5.2.1. Hibridização de DNA-DNA <i>in silico</i> (DDHis).....	44
5.2.2. ANI.....	46
5.3. <i>Multilocus Sequence Analysis</i> – MLSA.....	49
5.4. Genes de resistência a antibióticos	51
5.5. Ilhas genômicas	52
5.6. Virulência.....	58
6. DISCUSSÃO	61
6.1. Anotação do genoma de <i>Aeromonas sp V15</i>	61
6.2. Similaridade entre genomas	61
6.2.1. Hibridização de DNA-DNA <i>in silico</i> (DDHis).....	61
6.2.2. Identidade Média de Nucleotídeos (ANI).....	62
6.3. <i>Multilocus Sequence Analysis</i> – MLSA.....	63
6.4. Genes de resistência a antibióticos	64
6.4.1. Genes de resistência a beta-lactâmicos	64
6.4.2. Genes de resistência a macrolídeos.....	65
6.4.3. Genes de resistência a quinolona.....	66
6.5 Ilhas genômicas	67
6.5.1. Ilhas genômica 4	67
6.5.2. Ilhas genômica 10.....	68
6.5.3. Ilhas genômica 11.....	69
6.5.4. Ilhas genômica 5	69
6.6. Virulência.....	70
6.6.1. Motilidade e Adesão	70
6.6.2. Toxinas.....	71
6.6.3. Enzimas	72
6.6.4. Sistemas de Secreção.....	73
7. CONCLUSÕES	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

9. ANEXOS112

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), mais de 320 milhões de pessoas em todo o mundo podem contrair alguma doença, devido à contaminação da água por algum microrganismo patogênico (PNUMA, 2016). O tratamento da água destinada ao consumo humano é um dos fatores essenciais para a redução dos riscos de transmissão de alguma doença na água (FEWTRELL *et al.*, 2005; CLASEN *et al.*, 2015). Todavia, mesmo com o tratamento adequado da água potável, há patógenos com capacidades de resistir a desinfecção da água, sobreviver e recrescer na água tratada (WINGENDER & FLEMMING, 2011; FALKINHAM *et al.*, 2015). Entre estes microrganismos patogênicos que podem alcançar o consumidor final da água potável se destacam *Aeromonas spp.*

O gênero *Aeromonas* é formado por bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas e não esporulantes (IGBINOSA *et al.*, 2012). Entre as espécies de *Aeromonas* capazes de causar alguma doença em humanos, se destacam *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas veronii* biovar sobria e *Aeromonas dhakensis* (SPADARO *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2016; KALI *et al.*, 2016; VAN ZWETSELAAR *et al.*, 2018). As infecções mais comuns causadas por essas espécies de *Aeromonas* são as infecções gastrointestinais, as infecções em feridas e a septicemia (VASAIKAR *et al.*, 2002; AZZOPARDI *et al.*, 2011; BATRA *et al.*, 2016)

A severidade das manifestações clínicas observadas nas infecções por *Aeromonas spp* está associada à produção e/ou secreção de fatores de virulência (TOMÁS, 2012). No entanto a virulência de *Aeromonas* ainda não está bem estabelecida (RASMUSSEN-IVEY *et al.*, 2016) e vários fatores de virulência têm sido identificados em isolados de *Aeromonas* obtidos de ambientes aquáticos (MIYAGI *et al.*, 2017).

Os avanços das tecnologias de sequenciamento de nova geração e paralelamente, o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática permitiram, respectivamente, o sequenciamento em grande escala de genomas inteiros de patógenos e sua análise aprofundada ampliando a capacidade de estudo acerca da

patogenicidade, das regiões de plasticidade e da resistência a antimicrobianos de agentes infecciosos (KWONG *et al.*, 2015).

Assim o presente trabalho visa realizar uma análise genômica da cepa *Aeromonas* sp. V15 isolada de caixa d'água, através de ferramentas de bioinformática e desta forma identificar genes de virulência, genes de resistência a antibióticos e elementos genéticos móveis auxiliando na compreensão da patogenicidade desse microrganismo, podendo revelar informações importantes sobre a biologia do patógeno e auxiliar na compreensão da patogenicidade desse microrganismo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microrganismos emergentes na água potável

A mais de 100 anos atrás se iniciou a introdução da filtração seguida da desinfecção por cloro em água destinada ao consumo humano (NWACHCUKU & GERBA, 2004). A adoção desta prática reduziu drasticamente os casos de doenças associadas a água contaminada com resíduos fecais (ASHBOLT, 2004). Nos dias atuais, as estações de tratamento de água têm a finalidade de transformar a água denominada bruta, sem tratamento e imprópria ao consumo humano, em água potável adequada ao consumo humano.

As estações de tratamento de água empregam uma série de barreiras para remover os contaminantes e os microrganismos patogênicos da água bruta (SZEWZYK *et al.*, 2000). O objetivo deste princípio é obter uma água potável segura, isto é, livre de organismos que possam causar alguma doença no consumidor final (ASHBOLT, 2004). Os estágios do tratamento convencional incluem a coagulação, com o uso de sulfato e polímeros de alumínio, seguido de sedimentação, filtração e desinfecção (NWACHCUKU & GERBA, 2004).

Nos últimos anos, têm se atentado para patógenos capazes de resistir ao tratamento convencional da água e de sobreviverem nos sistemas de distribuição de água (FALKINHAM, 2015). Estes microrganismos podem alcançar o consumidor final da água potável, podendo trazer riscos à sua saúde (WINGENDER & FLEMMING, 2011). Estes organismos se caracterizam por serem residentes de todo sistema de tratamento de água sendo adaptados às condições oligotróficas da água tratada (FALKINHAM; *et al.*, 2015). Somado a isso, muitos desses organismos são considerados oportunistas, pois causam infecções em crianças, idosos e imunocomprometidos, (FALKINHAM, 2015). Entre estes microrganismos se destaca o *Aeromonas spp.*

2.2 Características gerais de *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas* são bacilos gram-negativos, anaeróbicos facultativos, quimiorganotróficos e não-esporulantes. A maioria das espécies possuem um único

flagelo polar, sendo que em algumas espécies podem ocorrer flagelos laterais (JANDA & ABBOTT, 2010; MARTIN-CARNAHAN & JOSEPH, 2015). Bioquimicamente, essas bactérias exibem propriedades oxidativas e um metabolismo fermentativo de D-glicose com a produção de ácido e muitas vezes produzindo gás (ABBOTT *et al.*, 2003). As espécies de *Aeromonas* produzem uma variedade de exoenzimas, tais como arilamidases, amilases, DNases, esterases, peptidases e outras enzimas hidrolíticas (MARTIN-CARNAHAN & JOSEPH, 2015).

São encontradas espécies de *Aeromonas* em rios, lagos, reservatórios, água potável, água subterrânea e em águas residuárias (JANDA & ABBOTT, 2010). As espécies *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas sobria* foram isoladas de águas subterrâneas até 20 metros de profundidade, sendo detectados até 220 UFC/100 ml destas espécies (GHENGHESH *et al.*; 2001; VILLARI *et al.*, 2003). Em águas superficiais as espécies mais prevalentes são *Aeromonas sobria*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas salmonicida* e *Aeromonas bestiarum* (BARON *et al.*, 2017), sendo largamente relatado a presença de isolados de *Aeromonas* em meses mais quentes (DRYDEN & MUNRO, 1989; WILCOX *et al.*, 1992; PABLOS *et al.*, 2009; KATZ *et al.*, 2015).

Espécies *Aeromonas* são encontradas na água potável, tanto na água bruta como após o tratamento (EGOROV *et al.*, 2011). O número de isolados de *Aeromonas* na água potável é variável, sendo observado entre 10^3 - 10^4 UFC/100 mL nos meses mais quentes (CHAURET *et al.*, 2001) e valores de 10^1 UFC/100 mL nos outros meses (FIGUEIRA *et al.*, 2011). É observado um aumento do número de isolados de *Aeromonas* entre a estação de tratamento e a água que chega ao consumidor, mesmo com a presença de cloro livre na água, este ressurgimento de microrganismos na água tratada é denominado recrescimento (HAVELAAR *et al.*, 1990; CHAURET *et al.*, 2001).

As espécies de *Aeromonas* apresentam resistência a cloração da água, sendo observado cepas resistentes a 1,2 mg/L de cloro (SISTI & ALBANO, 1998; SCOARIS *et al.*, 2008). Um fator importante para a resistência ao processo de cloração são as concentrações mínimas não inibitórias de cloro que podem exercer uma pressão seletiva sobre cepas de *Aeromonas* resistentes a cloração e diminuindo os competidores às fontes orgânicas de carbono (FALKINHAM; *et al.*, 2015). Outro fator

importante para o recrescimento de *Aeromonas* é a capacidade de se aderir a superfícies e formar biofilmes, o que permite este microrganismo sobreviver e persistir na água tratada (BOMO *et al.*, 2004). Biofilmes de *Aeromonas* foram reportados em canos de distribuição de água (FLEMMING *et al.*, 2002), reservatórios domésticos (MIYAGI; *et al.*, 2017) e torneiras (FERNÁNDEZ *et al.*, 2000). O desprendimento de células dos biofilmes para a fase d'água pode promover a exposição cepas patogênicas de *Aeromonas* ao consumidor final, podendo trazer risco à sua saúde.

2.3 Infecções causadas por *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas* foi reconhecido como um patógeno de peixes ainda na década de 1930, uma vez que isolados de *Aeromonas* foram identificados em inúmeros peixes com úlceras, porém o reconhecimento de *Aeromonas* como um patógeno humano foi bem lenta, apesar de alguns relatos ainda em 1930, o reconhecimento somente ocorreu 20 anos depois (PERCIVAL & WILLIAMS, 2014). Atualmente o gênero *Aeromonas* tem sido associado a variadas doenças, síndromes intestinais e extraintestinais, partindo de uma branda morbidade, como gastroenterite aguda, para doenças de alto risco de vida, como septicemia e fasciíte necrosante (JANDA & ABBOTT, 2010; IGBINOSA *et al.*, 2012). Baseado na ocorrência dos casos de infecções de *Aeromonas* as infecções podem ser divididas em gastroenterite, infecção em tecidos moles e feridas, septicemia, e outras infecções menos frequentes.

2.3.1 Gastroenterite

A gastroenterite causada por *Aeromonas* pode ser adquirida ou pela ingestão de água ou pelo consumo de alimentos contaminados (PABLOS *et al.*, 2011; MANA *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2015). As espécies de *Aeromonas* mais prevalentes em casos de gastroenterite são *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii* biovar sobria, *Aeromonas veronii* biovar veronii, *Aeromonas hydrophilia* e mais raramente *Aeromonas trota* (CHOPRA & HOUSTON, 1999; GHENGESH *et al.*, 2001;). Recentemente casos de gastroenterite causados por *Aeromonas dhakensis* têm sido reportados (CHEN *et al.*, 2016). Os casos de gastroenterite associada a *Aeromonas* acometem pacientes de todas as idades, incluindo pacientes saudáveis e

imunocomprometidos (PREDIGER *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2015). Há relatos de maior ocorrência de casos durante os meses quentes (LLOPIS *et al.*, 2004).

A sintomatologia de gastroenterite causada por *Aeromonas* é variada. Nos casos mais brandos e mais frequentes a gastroenterite pode ser caracterizada por uma diarreia aguda, aquosa e autolimitada, acompanhada ou não de sintomas como dor abdominal, febre, vômito e podendo se desenvolver para uma desidratação moderada, podendo durar até duas semanas (NOJIMOTO *et al.*, 1997; SHA *et al.*, 2002; JANDA & ABBOTT, 2010; SENDEROVICH *et al.*, 2012).

Em casos mais severos e menos comuns, há a presença de sangue e de muco nas fezes necessitando de hospitalização e podendo durar até dois meses (ESSERS *et al.*, 2000; LEE & PUTHUCHEARY *et al.*, 2001; CHAN *et al.*, 2003). A ocorrência de gastroenterite de maior severidade acomete recém-nascidos (PUTHUCHEARY *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2016), pessoas idosas (PEREIRA *et al.*, 2008) e imunocomprometidos (VON GRAEVENITZ, 2007). Em casos graves e raros, há o desenvolvimento de síndromes intestinais que duram mais de dois meses, com uma alta perda de água e de peso do indivíduo, sendo observado estes casos em indivíduos acometidos com a diarreia do viajante (JANDA & ABBOTT; 2010).

No Brasil há relatos de gastroenterite causadas por *Aeromonas* em diferentes estados da federação. NOJIMOTO e colaboradores (1997) analisaram 91 amostras de fezes diarreicas de crianças menores de 5 anos de idade, que davam entrada em um ambulatório na cidade de Goiânia – GO. Foi observado a presença de *Aeromonas* em 21,9% das amostras, sendo isoladas as seguintes espécies: *Aeromonas caviae* (7,7%), *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* (6,6%), *Aeromonas sobria* (4,3%), *Aeromonas hydrophila* (2,2%) e *Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes* (1,1%).

Em um estudo semelhante PEREIRA e colaboradores (2008) avaliaram 2.323 amostras de swabs retais de neonatos hospitalizados em unidades de terapia intensiva com sintomas de diarreia aguda na cidade do Rio de Janeiro durante o período de 1998 a 2006. Foram isoladas 56 cepas de *Aeromonas*, sendo as seguintes espécies mais isoladas *Aeromonas caviae* (42,8%), *Aeromonas media* (25%), *Aeromonas veronii* biovar *sobria* (10,7%), *Aeromonas hydrophila* (9%) e *Aeromonas*

veronii biovar *veronii* (5,3%). Por fim os autores recomendaram a adoção de diretrizes para o controle preventivo de infecções causadas por *Aeromonas* em unidades de terapia intensiva neonatal.

SUREK e colaboradores (2010) avaliaram 680 amostras de fezes de pacientes que apresentavam sinais clínicos de diarreia do estado do Paraná. Os autores identificaram *Aeromonas* em 2,6% das amostras analisadas, sendo *Aeromonas caviae* a espécie mais representativa. Além disso, os pacientes que apresentaram o maior número de isolados de *Aeromonas* foram indivíduos menores de 5 anos e maiores que 45 anos.

2.3.2 Infecção no tecido mole e feridas

O segundo local anatômico mais comum, do qual espécies de *Aeromonas* são recuperados são os tecidos moles subjacentes à epiderme e ao tegumento (JANDA & ABBOTT, 2010). A infecção se dá com o contato direto de lesões ou injúrias na pele com ambientes aquáticos contaminados com *Aeromonas*, como rios, cachoeiras e lagoas ou também em contato com o solo (DIAZ, 2014).

A manifestação clínica típica de infecção, é a formação de uma celulite infecciosa, podendo se agravar para uma lesão profunda que compromete as camadas de tecido podendo provocar uma fasciíte necrosante (CHAO *et al.*, 2013). Em casos severos pode se causar danos graves ao tecido muscular, como uma mionecrose e rabdomiólise (MARKOV *et al.*, 2007; MONAGHAN *et al.*, 2008). As espécies de *Aeromonas* relacionadas com infecção em tecidos são principalmente *Aeromonas hydrophilia* e *Aeromonas veronii* biovar *sobria* e *Aeromonas schubertii* (MARKOV *et al.*, 2007; MONAGHAN *et al.*, 2008; JANDA & ABBOTT, 2010).

As queimaduras causadas por fogo ou por eletricidade são inicialmente controladas pela exposição da injúria tecidual a água, torneira, bicas ou riachos, podendo estar contaminados por *Aeromonas* (KIENZLE *et al.*, 2000; AZZOPARDI *et al.*, 2011; AZZOPARDI *et al.*, 2014). Outra porta de entrada para a entrada para a infecção tecidual de *Aeromonas*, são picadas ou mordidas de vários animais, em particular de cobras e de outros répteis, uma vez que muitas vezes a flora orofaríngea desses animais abriga espécies de *Aeromonas* (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2008). No

Brasil, JORGE e colaboradores (1998) reportaram três casos de infecções em tecidos moles causadas por *Aeromonas hydrophila* após picadas de víboras. Segundo os autores essas cobras possuem um veneno miotóxico local, o que favoreceu a multiplicação de cepas de *Aeromonas hydrophila* no tecido lesado.

2.3.3 Septicemia

As espécies de *Aeromonas* associadas a septicemia são *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas veronii* biovar sobria (CHUANG *et al.* 2011; KIMURA *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2014) sendo que recentemente *Aeromonas dhakensis* tem sido isolado em casos de septicemia (CHEN *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2015).

Mais de 80% dos casos de septicemia acometem pessoas severamente imunocomprometidas (JANDA & ABBOTT, 2010), principalmente em pessoas com alguma desordem mieloproliferativa (TSAI *et al.*, 2006; TUMBARELLO *et al.*, 2009) ou doença crônica no fígado (KO *et al.*, 2000; LLOPIS *et al.*, 2004). As portas de entrada para a septicemia por *Aeromonas* são por meio do trato gastrointestinal, tecidos moles, intra-abdominal e o uso de cateteres de longa permanência contaminados (JANDA e ABBOTT, 2010).

Outro grupo afetado pela septicemia são pessoas que sofreram algum grande trauma e que desenvolvem a septicemia sem existir algum evento que predisponha a infecção (JANDA & ABBOTT, 2010). São reportados casos de septicemia em pessoas com traumas causados por fogo (LAI *et al.*, 2007), acidentes (MONAGHAN *et al.*, 2008) e mordidas de animais. Pessoas saudáveis e sem algum trauma anterior, também podem desenvolver septicemia por espécies de *Aeromonas*, no entanto estes casos são raros (CHUM & SONG, 2007).

Outro grupo acometido pela septicemia por *Aeromonas* são as pessoas que fazem uso de terapias com sanguessugas para fins de aliviar congestão venosa em procedimentos de medicina reconstrutiva. O uso de sanguessugas possui certo risco de infecção uma vez que entre o hirudíneo e *Aeromonas* há relações simbióticas (SILVER *et al.*, 2007). Em condições normais a terapia pode gerar celulites locais,

porém, em poucos casos pode se desenvolver casos de septicemia (OTT *et al.*, 2016; VERRIERE *et al.*, 2016).

2.3.4 Infecções diversas

Há outras infecções causadas por espécies de *Aeromonas* que ocorrem em menor prevalência. Como exemplos destas infecções se destacam: a infecção ocular (RUBIN *et al.*, 2013); no trato respiratório (ISSA & NAPOLITANO, 2011; CHAO *et al.*, 2013); a artrite (MUELLER & DANAHER, 2011; WANG *et al.*, 2014); a meningite (PAMPÍN *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2014; KALI *et al.*, 2016); e infecção no trato urinário (OJEDA-VARGAS *et al.*, 2005).

2.4 Mecanismos de patogenicidade e virulência

A patogenicidade *Aeromonas* envolve um grande número de fatores de virulência sendo considerada multifatorial. Somado a isso, há a transferência horizontal de genes que contribui para a aquisição de genes de resistência a antibióticos.

2.4.1. Adesão e Motilidade

A colonização do hospedeiro é uma etapa inicial do processo de infecção e inicia-se pela adesão da bactéria às células do hospedeiro. Em *Aeromonas* as estruturas envolvidas na adesão são o pili do tipo IV e os flagelos laterais e polar.

O pili são estruturas proteicas e filamentosas formadas por subunidades de pilina (LOWRY *et al.*, 2014). Em *Aeromonas* o pili do tipo IV desempenha um papel relevante na adesão e colonização de células epiteliais (PEPE *et al.*, 1996; BOYD *et al.*, 2008; LOWRY *et al.*, 2014). Este pili possui três famílias de proteínas que são Flp, Bfp e Tap. A família Bfp têm sido relacionada com a adesão de *Aeromonas* em superfícies abióticas e bióticas (MAIER & WONG, 2015). A família Tap não está implicada em processos de adesão, mas está envolvida em processos de secreção de toxinas como as aerolisinas e proteases, via T2SS (KIROV *et al.*, 2000). A família Flp não possui seu papel em processos infecciosos bem estabelecido, porém sabe-se que ela está envolvida na formação de biofilme (KIROV *et al.*, 2000; REARDON-

ROBINSON *et al.*, 2014). Além dessas funções, os pili também estão implicados em outras funções como ligação de fago (MANCHAK *et al.*, 2002; CHIBEU *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2012), transferência de DNA (SHU *et al.*, 2008; CEHOVIN *et al.*, 2013; BERRY *et al.*, 2016) e agregação celular (CLAVIJO *et al.*, 2010; OXARAN *et al.*, 2012; REARDON-ROBINSON *et al.*, 2014).

As espécies de *Aeromonas* mesófilas produzem o flagelo polar para o movimento em ambiente líquido e flagelo lateral em movimentos em superfície /swarming (RABAAN *et al.*, 2001; GAVÍN *et al.*, 2002; KIROV *et al.*, 2004). A motilidade decorrente da expressão dos flagelos polar e lateral exercem um papel relevante na adesão, colonização e invasão do *Aeromonas* no tecido do hospedeiro, além de participarem nos processos de formação de biofilme (KIROV *et al.*, 2004; MERINO *et al.*, 2014). Ao se realizar a inativação dos genes responsáveis pela biossíntese do flagelo polar (*flgE*, *flgN*, *flhA*, *fliJ*, *flmB*) e pela biossíntese de flagelo lateral (*lafA1*, *lafA2*) observou-se uma queda na aderência de *Aeromonas hydrophila* em células HEp-2 e na motilidade (JIANG *et al.*, 2015).

2.4.2. Toxinas

Após a adesão na célula do hospedeiro o gênero *Aeromonas* produz várias exotoxinas, que podem causar a destruição de extensos tecidos. Dois tipos de enterotoxinas estão implicadas na patogenicidade de *Aeromonas*: (1) as enterotoxinas citotóxicas, que provocam degeneração das criptas e vili no intestino, sendo isoladas em pacientes que sofrem diarreias toxinas citotóxicas (CHOPRA & HOUSTON, 1999; EROVA *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2015); e (2) as toxinas citotônicas atuam na elevação dos níveis de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) e prostaglandinas no epitélio intestinal levando a alteração do transporte iônico (SOLTAN DALLAL *et al.*, 2016).

Entre as toxinas citotóxicas se destacam a enterotoxina citotóxica termolábil (*act*), o qual possui atividade citotóxica hemolítica e enterotóxica, sendo primeiramente descrita em *Aeromonas dhakensis* SSU (FERGUSON *et al.*, 1997; VON GRAEVENITZ, 2007). O mecanismo de ação desta toxina é através da formação de poros na membrana da célula, levando a lise celular (TOMÁS, 2012; RASMUSSEN-IVEY *et al.*, 2016).

Outras toxinas com atividade de citotóxica são as hemolisinas, entre elas se destaca a hemolisina HlyA, que é composta por 439 resíduos de aminoácidos e foi descrita por EROVA *et al.*, (2007) em cepas de *Aeromonas dhakensis* SSU, sendo posteriormente encontrada tanto em isolados clínicos como ambientais.

Entre as toxinas citotônicas se destacam a enterotoxina citotônica termolábil (*alt*), uma lipase com 368 resíduos de aminoácidos. Esta toxina aumenta os níveis de AMPc e prostaglandinas na mucosa intestinal em modelos de ratos. (CHOPRA *et al.*, 1999; VON GRAEVENITZ, 2007). Outra toxina citotônica é a enterotoxina citotônica termoestável (*ast*), o qual provoca a secreção de fluidos no intestino delgado de ratos e aumenta os níveis de AMPc nas células mucosas (CHOPRA *et al.*, 1986).

2.4.3. Enzimas

O gênero *Aeromonas* é caracterizado por possuir um repertório vasto de enzimas, mesmo não estando envolvidas diretamente na infecção essas enzimas irão atuar na aquisição de nutrientes, na sobrevivência no meio e na superação das defesas do hospedeiro. A enolase foi identificada na superfície da cepa *Aeromonas dhakensis* SSU envolvida em diarreia, esta enzima facilita a migração da bactéria no hospedeiro (SHA *et al.*, 2003; 2009).

O gene *vacB* codifica a RNase R, o qual é uma exoribonuclease com 797 resíduos de aminoácidos, EROVA *et al.*, (2008), inativou os genes *vacB*, em cepas de *Aeromonas*, sendo observado uma perda de motilidade dessas cepas, além disso essa enzima permite o crescimento em baixas temperaturas (RASMUSSEN-IVEY *et al.*, 2016).

2.4.4. Sistema de Secreção

As bactérias gram-negativas desenvolveram diferentes sistemas de secreção, afim de transportar proteínas do citoplasma bacteriano para o espaço extracelular ou para o citoplasma de outra célula (TÓMAS, 2010). Em *Aeromonas* os sistemas de secreção envolvidos em processos infecciosos são o sistema de secreção tipo II (T2SS), sistema de secreção tipo III (T3SS) e sistema de secreção tipo VI (T6SS).

O T2SS é conservado em *Aeromonas* e está presente tanto em isolados ambientais, como em isolados clínicos (PANG *et al.*, 2015). O T2SS é conhecido também como a via principal de secreção, ou em inglês *general secretory pathway*, é utilizado por muitas bactérias gram-negativas para translocar proteínas dobradas através da membrana externa do periplasma para o meio extracelular (STROZEN *et al.*, 2011; KOROTKOV *et al.*, 2012). Em termos de virulência, em *Aeromonas dhakensis* SSU, o T2SS participa da translocação da toxina Act, do transporte de enzimas envolvidas em processos infecciosos como proteases, amilases e DNAase (TSENG *et al.*, 2009; PANG *et al.*, 2015), entretanto o papel de T2SS em processos infecciosos ainda não foi bem estabelecida

O T3SS consiste em um complexo multiproteico, que realiza a translocação de proteínas bacterianas, do citoplasma bacteriano para células eucarióticas através de uma única etapa (TOMÁS, 2012). O T3SS foi encontrado inicialmente em cepas virulentas de *Aeromonas* envolvidas em casos graves de diarreia (FADL *et al.*, 2006). A organização gênica do T3SS é variável nas espécies de *Aeromonas* (YU *et al.*, 2004). Foi observado que ao inativar os genes que codificam o sistema T3SS ocorre uma diminuição da citotoxicidade em camundongos, trabalhos similares também observaram a diminuição da patogenicidade (SHA *et al.*, 2007; SIERRA *et al.*, 2007).

O T6SS também realiza a translocação de proteínas da bactéria para a célula eucariótica hospedeira, sendo o T6SS estruturalmente homólogo à cauda contrátil de vírus bacteriófago, este sistema de secreção está estruturado em um tubo interno e uma placa de base (COSTA *et al.*, 2015). Ao realizar a inativação dos genes *vasH* e *vasK*, ambos genes codificam componentes do sistema de secreção de T6SS, os mutantes *vasH* e *vasK* foram menos tóxicos para macrófagos murinos e células HeLa epiteliais humanas, e esses mutantes foram mais eficientemente fagocitados pelos macrófagos, outros trabalhos também observaram dados semelhantes (SUAREZ *et al.*, 2008; 2010; SHA *et al.*, 2013).

2.5 Epidemiologia e surtos de *Aeromonas*

A incidência global de infecções causadas por *Aeromonas* é desconhecida (JANDA & ABBOTT, 2010). Todavia, a maioria dos dados disponíveis sugere que as infecções causadas por *Aeromonas* são adquiridas através da ingestão ou contato de

água contaminada (FINKELSTEIN & OREN, 2011), da ingestão de alimentos (produtos lácteos e carnes) (TSHETEN *et al.*, 2016) e da picada de répteis (JORGE *et al.*, 2004) ou mordidas de animais vertebrados (EASOW & TULADHAR, 2007).

HOFER *et al.* (2006) relatou um surto de *Aeromonas* no estado de Pernambuco no ano de 2004, foram registrados 2.170 casos de gastroenterite, sendo indivíduos de menores de cinco anos os mais afetados pela infecção. A ingestão de água contaminada foi considerada a principal rota de transmissão do patógeno. As espécies mais presentes nas coproculturas foram respectivamente *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii biovar sobria* e *Aeromonas veronii biovar veronii*.

Infecções por *Aeromonas spp* também são reportadas em enchentes e desastres ambientais. HIRANSUTHIKUL *et al.* (2005) relata em torno 770 casos de infecções na pele e nos tecidos moles causadas, em sua maioria por *Aeromonas* após o tsunami de 26 dezembro de 2004, na Tailândia. Semelhantemente foi observado um aumento casos de infecções na pele causadas por *Aeromonas* após a passagem do furacão Katrina, nos Estados Unidos (PRESLEY *et al.*, 2006).

2.6 Genômica

Desde o primeiro sequenciamento completo de uma bactéria que foi o *Haemophilus influenzae* em 1995 (FLEISCHMANN *et al.*, 1995), as tecnologias de sequenciamento evoluíram rapidamente. Nas últimas décadas se desenvolveram diferentes plataformas de sequenciamento de nova geração, que paralelizaram o processo de sequenciamento, levando à produção de milhares ou milhões de sequências. (MCADAM *et al.*, 2014). O sequenciamento de nova geração promoveu uma revolução na genômica, uma vez que o genoma inteiro de uma bactéria é capaz de fornecer uma resolução quase máxima sobre o todos os processos que ocorrem em um organismo (CHEUNG & KWAN, 2012).

O sequenciamento de um genoma, mesmo dos organismos mais simples, produz grandes quantidades de dados, o grande desafio da genômica é traduzir com eficiência os dados complexos do sequenciamento, em informações úteis que possam beneficiar não apenas a ciência, mas a saúde da população (KWONG *et al.*, 2015). Para extrair as informações essenciais de um genoma completo são necessárias

etapas de análise através de ferramentas de bioinformática para que se possa compreender todo o panorama dos processos biológicos que ocorrem em uma bactéria (QUAINOO *et al.*, 2017).

O sequenciamento de nova geração e a interpretação de dados genômicas por ferramentas de bioinformática têm sido utilizados para abordar questões fundamentais sobre a biologia de inúmeras doenças infecciosas (ALI *et al.*, 2012; BELLO-ORTÍ *et al.*, 2014; RUNCHAROEN *et al.*, 2017). Através da interpretação de dados genômicos pela bioinformática é possível identificar e caracterizar elementos genéticos associados a transferência horizontal de genes (GU *et al.*, 2009), genes de resistência à antibióticos e genes (HAFT, 2015), de que codificam como fatores de virulência (JONES *et al.*, 2015; SCARIA *et al.*, 2015). Além disso, os dados genômicos podem ser utilizados para estudos taxonômicos tanto através de análises de similaridades entre genomas ou por análise de *multilocus*

2.6.1. Banco de dados para genes de virulência e resistência a antibióticos

Conforme mais genomas são sequenciados, ocorre a proliferação de informações genéticas e bioquímicas resultando em um aumento maciço na informação molecular, no entanto, a extração dessas informações é muito dificultada pela falta de unificação desses dados (MCARTHUR *et al.*, 2013). Assim as bases de dados são cada vez mais comuns, para a unificação dos dados e para curadoria das sequências geradas depositadas.

Atualmente são descritos uma diversidade de genes, tipos e mecanismos de resistência a antibióticos, para a unificação desses dados foram criadas bases de dados específicas para genes de resistência a antibióticos (LIU & POP, 2009; MCARTHUR *et al.*, 2013). O *Pathosystems Resource Integration Center* (PATRIC) (ANTONOPOULOS *et al.*, 2017) (<https://www.patricbrc.org/>), é um banco de dados integrado de patogênese de bactéria, centrado em genômica e bioinformática. O PATRIC retém as anotações e identificadores do GenBank (CLARK *et al.*, 2016) e do RefSeq (O'LEARY *et al.*, 2016), além disso ele integra informações de outros bancos de dados de genes de resistência a antibióticos para realizar comparações dos dados públicos, permitindo encontrar rapidamente genomas e genes com informações obtidas das diferentes bases.

Genes que expressam fatores de virulência também possuem bancos de dados próprios como o *Virulence Factors Database* (VFDB) (CHEN *et al.*, 2005) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) o qual é uma base de dados que fornece informações sobre fatores de virulência bacteriana validados experimentalmente de dezesseis patógenos. Entre estes fatores de virulência se destacam os produtos extracelulares, como enzimas, toxinas e efetores secretados, produtos associados a células, como polissacarídeos capsulares e proteínas da membrana externa, além de produtos envolvidos na adesão a células ou tecidos, como pili e flagelos (CHEN *et al.*, 2005).

2.6.2. Ilhas genômicas

A transferência horizontal de genes é a transferência de genes de um organismo para outro sem que ocorra a reprodução. Este tipo de transferência possui a capacidade de facilitar a evolução microbiana e tem sido reconhecida há muito tempo (OCHMAN *et al.*, 2000). Algumas sequências de DNA adquiridas horizontalmente aparecem em clusters, sendo denominados ilhas genômicas (GI) (CHE *et al.*, 2014). Há vários métodos para a predição das ilhas genômicas, porém o mais difundido é pela diferença de conteúdo G+C, uma vez que em regiões de ilha ocorre uma redução dos valores de conteúdo G+C, quando comparado com todo genoma (LU & LEONG, 2016).

Dependendo dos genes presentes na ilha, ela pode ser classificada como ilha de patogenicidade pela presença de genes codificadores de fatores de virulência; ilha metabólica pela presença de genes envolvidos no metabolismo de metabólitos secundários; ilha de resistência pela presença de genes envolvidos na resistência à antibióticos ou drogas; e ilha de simbiose pela presença de genes que conferem adaptação ao ambiente (LANGILLE *et al.*, 2010).

A aquisição de GIs permite o ganho de um grande número de genes relacionados a adaptações complexas (DOBRINDT *et al.*, 2004; JUHAS *et al.*, 2009). Além disso, os genes dentro de GIs podem influenciar uma ampla gama de traços importantes: virulência, resistência a antibióticos, simbiose, *fitness*, metabolismo e assim por diante (DOBRINDT *et al.*, 2004; JUHAS *et al.*, 2009).

2.6.3. Similaridade entre genomas por ANI e DDHs

As técnicas de hibridização de DNA (DDH), também conhecidas como reassociação de DNA-DNA, baseiam-se em uma tentativa de fazer comparações brutas de genomas inteiros entre diferentes organismos, a fim de calcular as suas semelhanças globais genômicas (ROSSELLÓ-MÓRA & LOPÉS, 2011). A hibridização de DNA é aplicada na identificação taxonômica de uma cepa desconhecida, no entanto, a técnica apresenta um custo elevado e diferenças de resultados entre os laboratórios que a realizam (AUCH *et al.*, 2010).

Com o desenvolvimento da genômica, diferentes algoritmos e softwares surgiram buscando se emular *in silico* os valores de DNA-DNA hibridização, as metodologias mais empregadas são a identidade média de nucleotídeos (ANI) do inglês de *Average Nucleotide Identity* e o DNA-DNA *in silico* (DNAis)

Na abordagem utilizada por DDHs o genoma em estudo é comparado *in silico* com um genoma de referência, a distância intergenômica é calculada pela soma de todas as identidades encontradas nos segmentos de alta pontuação (HSPs) do inglês *High-Scoring Segment Pair*, são divididas pelo comprimento global de HSPs. Dessa maneira, os dados são convertidos em valores de similaridade análogas ao DDH para apoiar a decisão sobre o parentesco da nova estirpe com estirpes conhecidas (AUCH *et al.*, 2010).

Outra abordagem é o ANI, porém essa metodologia estima a identidade média de nucleotídeos entre dois genomas. O genoma em estudo é fragmentado *in silico* em segmentos de 1.020 nucleotídeos, os quais são alinhados utilizando o algoritmo do BLAST contra um genoma de referência a fim de calcular a identidade média dos nucleotídeos (GORIS *et al.*, 2007).

2.6.4. Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

O gene 16S rRNA foi, e ainda é aplicado como gene marcador universal para análise evolutiva básica de bactérias cultiváveis e não cultiváveis. Isto se deve

principalmente ao fato de que o gene 16S rRNA preenche a maioria dos requisitos de um bom marcador filogenético, pois ocorre em todas as bactérias e archaeas, tem uma função indispensável na síntese proteica, que está ligada à sua evolução e conservação, além disso também contém um amplo espectro de variações de sequência, baseado principalmente em sua estrutura secundária formada nos ribossomos (WOESE & FOX, 1977; GLAESER & KÄMPFER, 2015).

A principal desvantagem da aplicação do gene 16S rRNA como marcador filogenético é a sua resolução insuficiente ao nível da espécie. Portanto, as relações filogenéticas no nível da espécie dentro de um gênero não podem ser resolvidas de forma suficiente. Uma resolução filogenética mais alta, especialmente dentro dos gêneros, pode ser obtida realizando adicionalmente análises filogenéticas baseadas em genes codificadores de proteínas (GLAESER & KÄMPFER, 2015).

A técnica *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) baseia-se na análise das sequências de nucleotídeos de vários genes, entre eles os denominados genes *housekeeping*. Tais genes são mais conservados e essenciais para a manutenção de funções celulares básicas encontradas em qualquer organismo (ALMEIDA *et al.*, 2010; MARCELLETTI *et al.*, 2010). As sequências são comparadas por similaridade e, em adição, as análises filogenéticas são realizadas com bases em matrizes de similaridade ou diretamente da sequência. Assim, a técnica de MLSA é mais adequada para separação de espécies (CHRISTENSEN *et al.*, 2007).

Portanto, o presente trabalho visa realizar uma análise de genômica comparativa da cepa *Aeromonas* sp. V15 isolada de caixa d'água, através do sequenciamento de nova geração e interpretação dos dados obtidos por ferramentas de bioinformática, com o objetivo de identificar genes de virulência, genes de resistência a antibióticos e elementos genéticos móveis, assim como realizar análises de similaridade com outras cepas de *Aeromonas*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Determinar e analisar o genoma da cepa *Aeromonas* sp. V15 isolada de biofilme de reservatório de água potável e realizar análises de genômica comparativa.

3.2 Objetivos Específicos

- Sequenciar o genoma de *Aeromonas* sp. V15;
- Montar o genoma sequenciado;
- Realizar anotação do genoma sequenciado;
- Determinar a similaridade entre o genoma sequenciado e outros genomas de *Aeromonas*;
- Realizar análise de *multilocus sequence analysis*;
- Verificar a presença de ilhas genômicas;
- Verificar a presença de genes de resistência a antibióticos;
- Verificar a presença de genes relacionados a patogenicidade;

4. METODOLOGIA

Os experimentos descritos neste trabalho foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Ambiental da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO) e no Laboratório de Genoma do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes na Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ) em colaboração com o professor Rodolpho Albano.

4.1 Obtenção da amostra

A bactéria *Aeromonas sp.* V15 foi isolada de biofilme de reservatório de caixa d'água contendo água potável, foi obtida da coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia Ambiental da UEZO. Para a extração do DNA genômico, a bactéria foi crescida em meio LB a 30°C por 24 horas, centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm e utilizado o kit *PowerSoil* da MoBio® de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%, e a quantificação foi realizada utilizando o NanoDrop (*ThermoFisher Scientific*).

4.2 Sequenciamento e montagem do genoma

Na determinação do genoma foi utilizado o kit Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) para a construção da biblioteca genômica, sendo geradas sequências do tipo *paired-end* usando 600 ciclos com o reagente *MiSeq Reagent Kit v3*. A montagem do genoma foi feita com o auxílio do programa A5-MiSeq (COIL et al., 2015). Gerando um genoma de 35 *contigs*. A visualização do genoma foi obtida no servidor CGView (GRANT & STOTHARD, 2008).

4.3 Anotação do genoma

A anotação de genoma foi realizada por meio do RAST (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>), que é uma ferramenta online de anotação automática de genomas de Bacteria e Archaea (AZIZ et al., 2008). A metodologia empregada identifica as regiões codificantes de proteínas, rRNA e tRNA, após atribui funções aos genes prevendo em quais subsistemas estão representados no genoma, por fim essas informações são utilizadas para reconstruir uma rede metabólica e gerar arquivos de

saída que podem ser descarregados pelo usuário, ou ainda, pode se realizar análise comparativa entre o genoma anotado e outros genomas mantidos no ambiente SEED (AZIZ *et al.*, 2008).

4.4 Similaridade de genomas

As análises de similaridade visam determinar o grau de identidade entre os genomas de duas espécies. Foram utilizadas duas metodologias para a medição de similaridade: o ANI – Identidade média de nucleotídeo e o DDH_{is} – DNA-DNA hibridização *in silico*. Para a análise ANI, utilizou-se o JSpeciesWS (RICHTER *et al.*, 2015) (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>), que é uma ferramenta online de medição de ANI baseado em BLAST e MUMmer, assim como, realiza a quantificação de tetranucleotídeo, sendo escolhida a medição de ANI baseada em BLAST.

Para a medição de DDH_{is} foi utilizado o GGDH *Genome-to-Genome Distance Calculator* (THOMPSON *et al.*, 2013) (<http://ggdc.dsmz.de/>) que é um serviço web que calcula as distâncias intergenômicas e as converte em valores de similaridade análogas ao DDH para apoiar a decisão sobre o parentesco das novas cepas com cepas conhecidas. Em ambas análises o genoma de *Aeromonas spp.* V15 foi utilizado como referência contra outras cepas de *Aeromonas* apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Genomas das cepas do gênero *Aeromonas*, que foram utilizados nas análises de GGDH, ANI e *multilocus*, assim como os respectivos números de acesso destas cepas.

Espécies de <i>Aeromonas</i>	Cepas	Números de Acesso	Referência
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	TTU2014-159ASC	LKKI01000001-LKKI01000048	WEBB <i>et al.</i> , 2016
<i>Aeromonas australiensis</i>	CECT 8023	CDDH01000001-CDDH01000113	Não publicado
<i>Aeromonas bestiarum</i>	GA97-22	PPUX01000001-PPUX01000026	Não publicado
<i>Aeromonas bivalvium</i>	CECT 7113	CDBT01000001-CDBT01000063	Não publicado

<i>Aeromonas cavernicola</i>	MDC 2508	PGGC0100001- PGGC01000314	COLSTON <i>et al.</i> , 2018
<i>Aeromonas caviae</i>	8LM	CP024198	MORIEL <i>et al.</i> , 2015
<i>Aeromonas caviae</i>	A23	LFXO01000001- LFXO01000143	Não publicado
<i>Aeromonas caviae</i>	Ae398	CACP01000001- CACP01000149	BEATSON <i>et al.</i> , 2011
<i>Aeromonas caviae</i>	BWH65	LESK01000001- LESK01000026	Não publicado
<i>Aeromonas caviae</i>	CECT 4221	CDBS01000001- CDBS01000332	Não publicado
<i>Aeromonas caviae</i>	CECT 838	CDBK01000001- CDBK01000111	Não publicado
<i>Aeromonas caviae</i>	CH129	MDSD01000001- MDSD01000026	CARDOZO <i>et al.</i> , 2016
<i>Aeromonas caviae</i>	CHZ306	MDSC01000001- MDSC01000065	Não publicado
<i>Aeromonas caviae</i>	FDAARGOS_72	CP026055	Não publicado
<i>Aeromonas caviae</i>	FDAARGOS_75	JTBH02000001	Não publicado
<i>Aeromonas caviae</i>	FDAARGOS_76	JTBG02000001 - JTBG02000010	Não publicado
<i>Aeromonas caviae</i>	L12	JWJP01000001- JWJP01000091	CHAN <i>et al.</i> , 2015
<i>Aeromonas caviae</i>	VBF856	LXJO01000001- LXJO01000216	Não publicado
<i>Aeromonas caviae</i>	YL12	JOVP01000001- JOVP01000030	Não publicado
<i>Aeromonas caviae</i>	429865	LIIX01000001- LIIX01000004	PADILLA <i>et al.</i> , 2015
<i>Aeromonas dhakensis</i>	SSU	JDWD01000001- JDWD01000271	Não publicado
<i>Aeromonas diversa</i>	CDC 2478-85	APVG01000001: APVG01000104	FARFÁN <i>et al.</i> , 2013
<i>Aeromonas encheleia</i>	CECT 4342	CDDI01000001- CDDI01000035	Não publicado

<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	1999lcr	JMGO02000001- JMGO02000018	Não publicado
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	CECT 4224	CDDF01000001- CDDF01000022	Não publicado
<i>Aeromonas finlandiensis</i>	4287D	JRGK01000001- JRGK01000376	ALPERI <i>et al.</i> , 2010
<i>Aeromonas fluvialis</i>	LMG 24681	CDBO01000001- CDBO01000076	Não publicado
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ML09-119	CP005966	TEKEDAR <i>et al.</i> , 2013
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	ATCC 7966	CP000462	SESHADRI <i>et al.</i> , 2006
<i>Aeromonas jandaei</i>	Riv2	JFDL01000001- JFDL01000043	Não publicado
<i>Aeromonas lacus</i>	AE122	JRGM01000001- JRGM01000196	HOSSAIN <i>et al.</i> , 2014
<i>Aeromonas lusitana</i>	MDC 2473	PGCP01000001- PGCP01000066	COLSTON <i>et al.</i> , 2018
<i>Aeromonas media</i>	WS	CP007567.1	CHAI <i>et al.</i> , 2012
<i>Aeromonas molluscorum</i>	848T	AQGQ01000001- AQGQ01000309	SPATARO <i>et al.</i> , 2013
<i>Aeromonas piscicola</i>	LMG 24783	CDBL01000001- CDBL01000091	Não publicado
<i>Aeromonas popoffii</i>	CIP 105493	CDBI01000001- CDBI01000105	Não publicado
<i>Aeromonas rivuli</i>	DSM 22539	CDBJ01000001- CDBJ01000102	FIGUERAS <i>et al.</i> , 2011
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	AS03	AMQG02000001- AMQG02000069	HAN <i>et al.</i> , 2013
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	RFAS1	CP017143.1	Não publicado
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	34mel	CP022426	PAVAN <i>et al.</i> , 2013
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	A449	CP000644.1	REITH <i>et al.</i> , 2008

<i>Aeromonas sanarellii</i>	LMG 24682	CDBN01000001- CDBN01000098	Não publicado
<i>Aeromonas schubertii</i>	CECT 4240	CDDB01000001- CDDB01000111	Não publicado
<i>Aeromonas simiae</i>	CIP 107798	CDBY01000001- CDBY01000100	Não publicado
<i>Aeromonas sobria</i>	08005	MKFU01000001- MKFU01000066	YANG <i>et al.</i> , 2017
<i>Aeromonas</i> sp.	HZM	JEMQ01000001- JEMQ01000120	CHUA <i>et al.</i> , 2015
<i>Aeromonas taiwanensis</i>	LMG 24683	BAWK01000001- BAWK01000104	WANG <i>et al.</i> , 2014
<i>Aeromonas tecta</i>	CECT 7082	CDCA01000001- CDCA01000051	Não publicado
<i>Aeromonas veronii</i>	B565	CP002607.1	LI <i>et al.</i> , 2011
<i>Aeromonas veronii</i> biovar <i>sobria</i>	LMG 13067	CDBQ01000001- CDBQ01000072	Não publicado
<i>Aeromonas veronii</i> biovar <i>veronii</i>	CCM4359	MRZR01000001- MRZR01000056	Não publicado

4.5 Multilocus Sequence Analysis – MLSA

Para a análise de sequências *multilocus* foram utilizadas as sequências de aminoácidos em formato ‘FASTA’ de genes *housekeeping*, ou seja, mantenedores das funções celulares básicas, expressos em todos os organismos sob condições normais. Foram utilizadas as cepas da **Tabela 1** para análise de multilocus.

Os genes foram selecionados segundo estudos realizados com genes *housekeeping* em *Aeromonas* (SESHADRI *et al.*, 2006; MARTINEZ-MURCIA *et al.*, 2011; COLSTON *et al.*, 2014;). A **Tabela 2** apresenta os genes usados na análise.

Tabela 2 - Genes *housekeeping* utilizados para a reconstrução filogenética

Gene	Produto
<i>mdh</i>	Malato desidrogenase
<i>atpD</i>	Subunidade beta da ATP sintetase
<i>dnaJ</i>	Chaperona molécula DNAJ
<i>gltA</i>	Citrato sintetase
<i>rpoH</i>	RNA polimerase polimerase fator sigma RpoH
<i>rpoN</i>	RNA polimerase fator sigma RpoN
<i>gyrB</i>	DNA girase subunidade B
<i>rpoD</i>	RNA polimerase fator sigma RpoD
<i>rpoE</i>	RNA polimerase fator sigma E
<i>groel</i>	Proteína Heat-shock 60
<i>metG</i>	tRNA metionina sintetase

Inicialmente, foram obtidas as sequências de nucleotídeos dos genes *housekeeping* de *Aeromonas sp* V15 no anotador automático RAST, as sequências das outras cepas foram obtidas utilizando a sequência obtida no RAST como *query* em um BLASTn. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado no Seaview (EDGAR, 2004). As sequências de DNA foram traduzidas para proteínas e alinhadas pelo algoritmo MUSCLE, sendo utilizadas as configurações padrões do algoritmo para o alinhamento – score de 1.0 para abertura de gap, 0 para extensão de gap, 1.0 para multiplicador de hidrofobicidade e máximo de iterações 16. Logo depois as sequências foram verificadas manualmente para a retirada de gaps e dados em falta. O alinhamento resultante foi concatenado para a construção da árvore filogenética. A história evolutiva foi inferida utilizando o método de distância através do algoritmo *Neighbor joining* (SAITOU & NEI, 1987) sendo utilizado o teste Jukes Cantor (STEEL & FU, 1995), sendo utilizada uma árvore de consenso *bootstrap*, deduzida a partir de 1000 réplicas.

4.6 Resistência a antibióticos

A presença de genes que conferem resistência a antibióticos foi realizada através do uso do PATRIC (ANTONPOULOS *et al.*, 2017)

(<https://www.patricbrc.org/>). Para a predição de genes de associados à resistência a antibióticos, o PATRIC realiza uma anotação do genoma submetido, utilizando o RAST como anotador, após isso PATRIC realiza um BLASTp em três banco de dados de resistência de antibióticos, o banco de dados do próprio PATRIC, no banco NDARO (*National Database of Antibiotic Resistant Organisms*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/>) e no banco CARD (*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) (MCARTHUR et al., 2013) (<https://card.mcmaster.ca/>). Ao final o PATRIC seleciona os genes que obtiveram valores de identidades maiores que 95%. Após a análise os genes identificados pelo PATRIC foram confirmados por BLASTp.

4.7 Presença de ilhas genômicas

Para a predição de ilhas genômicas inicialmente o genoma de *Aeromonas* sp V15 foi submetido ao CONTIGuator (GALARDINI et al., 2015) (<http://combo.db.e.unifi.it/contiguator>), uma ferramenta online para mapeamento de *contigs* sobre um genoma de referência completo permitindo a visualização de um mapa de *contigs*, evidenciando perda e / ou ganho de elementos genéticos e além disso, cria um *draft* genoma completo com *gaps*. Para a análise foi utilizado a cepa *Aeromonas caviae* 8LM, como referência, uma vez que a cepa possui o genoma completo e possui uma identidade com *Aeromonas* sp V15. O *draft* genoma completo gerado do mapeamento foi reanotado no RAST e foi utilizado apenas na análise de predição de ilhas genômicas.

As ilhas genômicas foram preditas pelo software GIPSY versão 1.1.2. (SOARES et al., 2016) que se utiliza das seguintes metodologias para a predição de ilhas: (1) desvio da assinatura genômica através do desvio de conteúdo G+C e/ou no uso de códons; (2) identifica genes que codificam transposases, fatores de virulência, resistência a antibióticos, genes associados ao metabolismo e simbiose; (3) verifica a presença de genes de RNA transportadores flanqueando essas regiões; (4) a ausência desses genes em outros organismos do mesmo gênero e espécie. O *software* prevê quatro classes de ilhas genômicas classificadas em: (i) ilhas de patogenicidade, que carregam genes de virulência; (ii) ilhas metabólicas, que abrigam genes associados à biossíntese de metabólitos secundários; (iii) ilhas de resistência

que contém genes codificadores de proteínas relacionadas com resistência à antibióticos; e (iv) ilhas simbióticas que fornecem à bactéria um repertório genômico para sustentar uma relação simbiótica hospedeiro-bactéria (SOARES et al., 2016). Para a predição de ilhas genômicas foi utilizado o genoma de *Aeromonas sp* V15 gerado na ferramenta CONTIGuator e como genoma de referência foi utilizado *Aeromonas caviae* FDAARGOS 75, uma vez que este genoma foi utilizado anteriormente na determinação de ilhas genômicas de outras cepas de *Aeromonas caviae* (MORIEL,2017)

A presença de prófagos no genoma de *Aeromonas sp* V15 foi detectada utilizando a ferramenta online PHASTER (ARNDT et al., 2016) (<http://www.phaster.ca/>). A metodologia empregada pelo PHASTER se baseia na realização de um BLAST do arquivo de entrada, no formato GenBank ou FASTA, contra o banco de dados de prófagos/fagos do NCBI e ao banco de dados *prophageDB*.

4.8 Virulência

Para a predição de genes de virulência foi utilizado o banco de dados VFDB (CHEN et al., 2005) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) que é banco de dados de fatores de virulência formado por cepas de dezesseis patógenos bacterianos, que possuem demonstrados experimentalmente a funcionalidade de seus fatores de virulência. Foi realizado um BLASTp entre o genoma de *Aeromonas sp* V15 e o banco de dados de VFDB sendo escolhidos genes que possuíam valores acima de 95% e que estavam envolvidos em processos de patogenicidade em células humanas. Os genes envolvidos pela biossíntese de sistemas de secreção e flagelo polar foram submetidos ao *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (KANEHISA et al., 2004) (<https://www.genome.jp/kegg/>) para a observação da organização de suas estruturas.

5. RESULTADOS

5.1 Anotação do genoma *Aeromonas sp* V15

A anotação do genoma de *Aeromonas sp* V15 foi realizado pela ferramenta online RAST. O conteúdo GC foi de 61.8%, sendo preditos ao todo 4337 genes com 4028 CDS (regiões codificadoras de proteínas) e 144 genes de RNA estruturais (RNA ribossômico e RNA transportador).

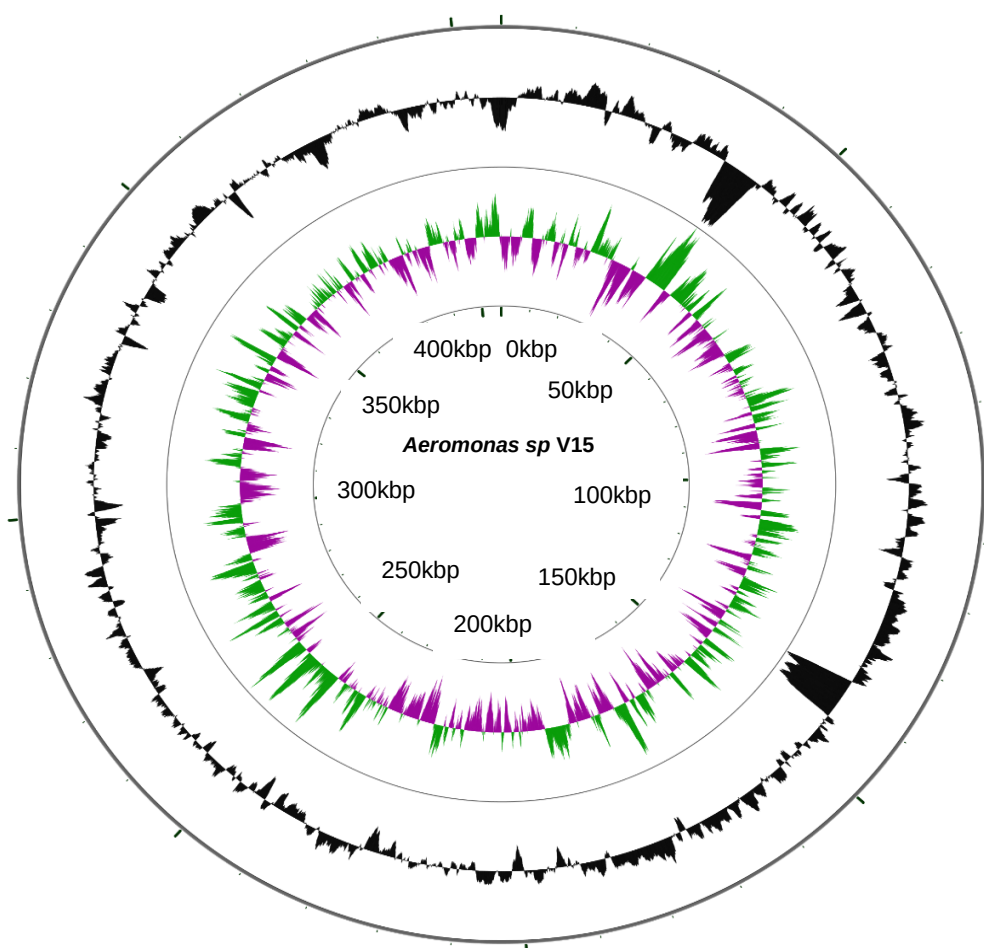


Figura 1 Mapa circular do genoma de *Aeromonas sp* V15 obtido pelo GCView, baseado na anotação do RAST. Partindo de dentro para fora, no círculo central as posições ao redor do genoma de *Aeromonas sp* V15, o círculo posterior representa o de GC skew sendo que os valores positivos são representados pela cor rosa e os valores negativos cor verde. O círculo mais externo representa o conteúdo de G + C

sendo a linha de base valor médio de 61,7% de conteúdo G+C. O círculo mais exterior são os marcadores de posição no genoma de *Aeromonas sp* V15.

Foram categorizados em subsistemas 3.307 genes de *Aeromonas sp* V15. Como mostrado pela **Figura 2**.

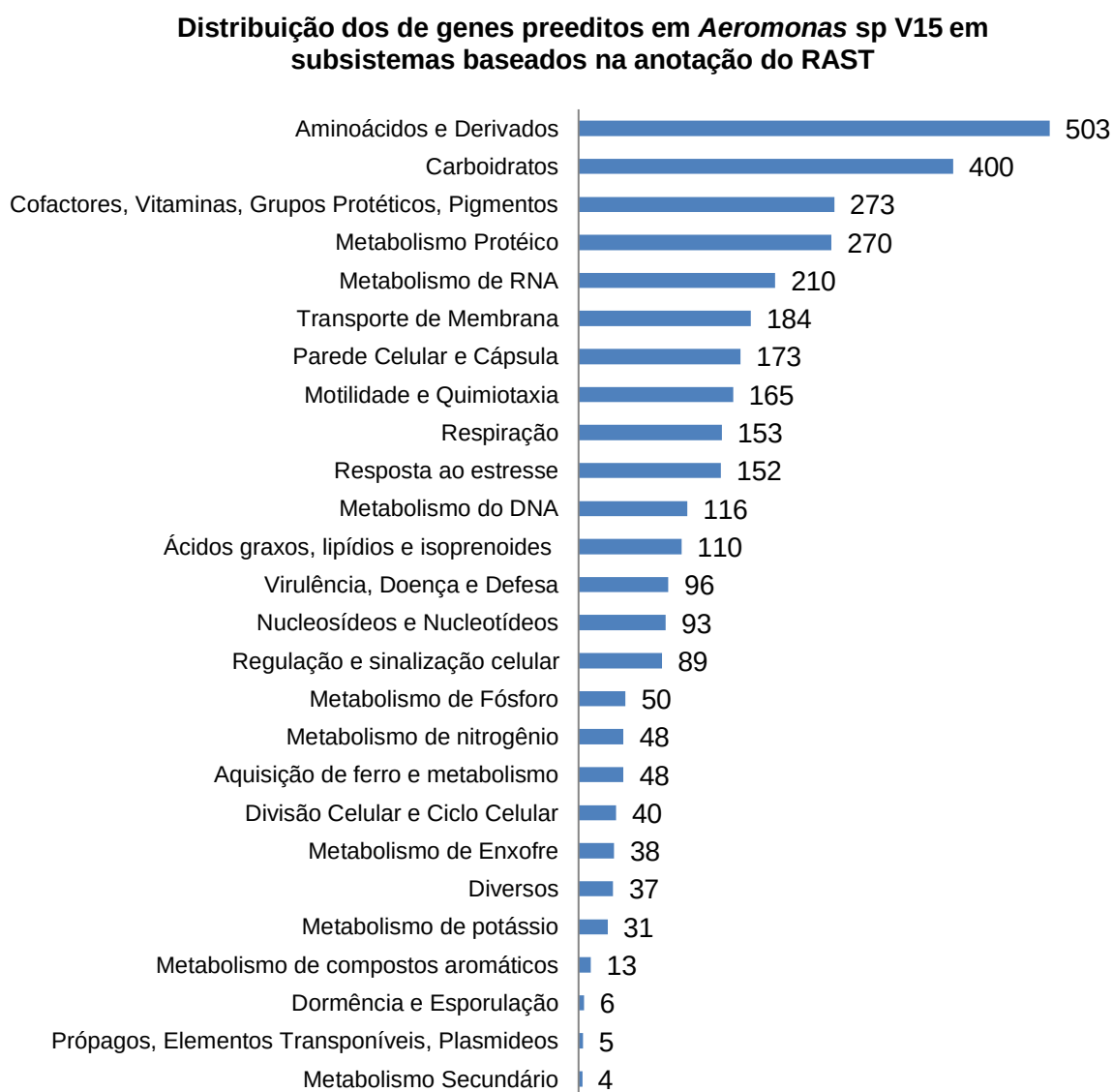


Figura 2 Distribuição dos de genes preeditos em *Aeromonas sp* V15 em subsistemas baseados na anotação do RAST

5.2 Similaridade dos genomas

Para as análises de similaridade entre os genomas se empregou duas metodologias, as quais foram a ANI e DDH's. Para a determinação de ANI se utilizou a ferramenta online JspeciesWS e para a determinação da DDH's utilizou se a ferramenta online GGDH-DDH. Em ambas análises *Aeromonas sp* V15 foi utilizado como referência frente as outras cepas.

5.2.1 Hibridização de DNA-DNA *in silico* (DDH's)

Os resultados obtidos pela ferramenta GGDH-DDH estão apresentados na **Tabela 3**. Os dados se referem a cepa *Aeromonas sp*. V15 comparada com as cepas de *Aeromonas* da **Tabela 1**. Todas as cepas de *Aeromonas caviae* e a cepa *Aeromonas sp*. HZM obtiveram os valores de DDH's valores maiores que 70%. Sendo que a cepa *Aeromonas caviae* 8lm apresentou o maior valor seguida de *Aeromonas caviae* 429865 e *Aeromonas caviae* CH129, respectivamente.

Tabela 3 Os resultados, respectivamente, de DDH's em percentual, da distância genômica (Dist.) e da probabilidade do valor de DDH's ser maior que 70% (DDH>70%) das cepas que utilizadas para a análise de DDH's da **Tabela 1** contra *Aeromonas sp* V15. Os dados estão ordenados dos maiores valores DDH's para os menores valores. Assim como as cepas que obtiveram valores maiores que 70% estão sombreadas.

Espécies	Cepas	DDH's (%)	Dist.	DDH >70%
<i>Aeromonas caviae</i>	8LM	85	0.0176	93.75
<i>Aeromonas caviae</i>	429865	84	0.0187	93.21
<i>Aeromonas caviae</i>	CH129	83.5	0.0193	92.94
<i>Aeromonas caviae</i>	A23	83.2	0.0196	92.75
<i>Aeromonas sp.</i>	HZM	82.6	0.0203	92.41
<i>Aeromonas caviae</i>	FDAARGOS_76	82.5	0.0205	92.31
<i>Aeromonas caviae</i>	CHZ306	82.3	0.0207	92.19
<i>Aeromonas caviae</i>	BWH65	82	0.021	92

<i>Aeromonas caviae</i>	Ae398	82	0.0211	91.98
<i>Aeromonas caviae</i>	CECT 4221	81.7	0.0214	91.8
<i>Aeromonas caviae</i>	FDAARGOS_75	81.5	0.0217	91.64
<i>Aeromonas caviae</i>	CECT 838	81.4	0.0217	91.6
<i>Aeromonas caviae</i>	L12	81.3	0.0218	91.54
<i>Aeromonas caviae</i>	FDAARGOS_72	81.2	0.0219	91.47
<i>Aeromonas caviae</i>	YL12	81.2	0.0219	91.47
<i>Aeromonas caviae</i>	VBF856	80.8	0.0224	91.16
<i>Aeromonas sanarellii</i>	LMG 24682	40	0.0994	2.73
<i>Aeromonas taiwanensis</i>	LMG 24683	37.8	0.1072	1.52
<i>Aeromonas media</i>	WS	34.6	0.12	0.57
<i>Aeromonas dhakensis</i>	SSU	32.3	0.1305	0.26
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ML09-119	32.2	0.1308	0.25
<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>subsp. hydrophila</i>	ATCC 7966	32.2	0.1306	0.25
<i>Aeromonas encheleia</i>	CECT 4342	30.2	0.141	0.11
<i>Aeromonas aquatica</i>	AE235	30.1	0.1413	0.11
<i>Aeromonas</i> <i>eucrenophila</i>	CECT 4224	29.9	0.1424	0.1
<i>Aeromonas lusitana</i>	MDC 2473	29.6	0.1446	0.09
<i>Aeromonas bestiarum</i>	GA97-22	29.4	0.1455	0.08
<i>Aeromonas piscicola</i>	LMG 24783	28.8	0.149	0.06
<i>Aeromonas tecta</i>	CECT 7082	28.7	0.1493	0.06
<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>subsp. pectinolytica</i>	34mel	28.3	0.152	0.05
<i>Aeromonas</i> <i>enteropelogenes</i>	1999lcr	28.2	0.1525	0.05
<i>Aeromonas popoffii</i>	CIP 105493	28.2	0.1527	0.05
<i>Aeromonas veronii</i>	B565	28.2	0.1522	0.05
<i>Aeromonas veronii</i> <i>biovar sobria</i>	LMG 13067	28.2	0.1523	0.05

<i>Aeromonas veronii</i> <i>biovar veronii</i>	CCM4359	28.1	0.153	0.05
<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>subsp. achromogenes</i>	AS03	28	0.1539	0.04
<i>Aeromonas bivalvium</i>	CECT 7113	27.9	0.1545	0.04
<i>Aeromonas finlandiensis</i>	4287D	27.9	0.1545	0.04
<i>Aeromonas jandaei</i>	Riv2	27.9	0.1544	0.04
<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>subsp. masoucida strain</i>	RFAS1	27.9	0.1543	0.04
<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>subsp. salmonicida</i>	A449	27.9	0.1545	0.04
<i>Aeromonas fluvialis</i>	LMG 24681	27.8	0.155	0.04
<i>Aeromonas</i> <i>allosaccharophila</i>	TTU2014- 159ASC	27.7	0.1556	0.04
<i>Aeromonas lacus</i>	AE122	27.7	0.1553	0.04
<i>Aeromonas</i> <i>australiensis</i>	CECT 8023	27.4	0.1575	0.03
<i>Aeromonas sobria</i>	8005	26.8	0.1613	0.02
<i>Aeromonas cavernicola</i>	MDC 2508	25	0.1742	0.01
<i>Aeromonas</i> <i>molluscorum</i>	848T	24.7	0.1766	0.01
<i>Aeromonas rivuli</i>	DSM 22539	24.7	0.1762	0.01
<i>Aeromonas diversa</i>	CDC 2478-85	23	0.1907	0
<i>Aeromonas simiae</i>	CIP 107798	23	0.1902	0
<i>Aeromonas schubertii</i>	CECT 4240	22.9	0.1912	0

5.2.2 ANI

Os resultados obtidos de ANI obtidos através da ferramenta JspeciesWS são mostrados na **Tabela 4**. Os dados se referem ao *Aeromonas sp V15* comparado com as espécies de *Aeromonas* da **Tabela 1**. Todas as cepas de *Aeromonas caviae* e a cepa *Aeromonas sp. HZM* obtiveram os maiores valores de ANI. Sendo que a cepa

Aeromonas caviae 8lm apresentou o maior valor seguida de *Aeromonas caviae* CH129 e *Aeromonas caviae* 429865

Tabela 4 - Os resultados, respectivamente, de ANI em percentual e do alinhamento em percentual das cepas utilizadas para a análise de DDHs da **Tabela 1** contra *Aeromonas sp* V15. Os dados estão ordenados dos maiores valores ANI para os menores valores. Assim como as cepas que obtiveram valores maiores que 96% estão sombreadas.

Espécies	Cepas	ANI [%]	Alinhamento [%]
<i>Aeromonas caviae</i>	8LM	98.14	92.53
<i>Aeromonas caviae</i>	CH129	97.91	89.56
<i>Aeromonas caviae</i>	429865	97.88	88.49
<i>Aeromonas caviae</i>	BWH65	97.81	90.74
<i>Aeromonas caviae</i>	FDAARGOS_75	97.77	91.8
<i>Aeromonas caviae</i>	CECT 838	97.77	91.25
<i>Aeromonas sp.</i>	HZM	97.76	88.59
<i>Aeromonas caviae</i>	FDAARGOS_72	97.74	92.47
<i>Aeromonas caviae</i>	A23	97.74	89.11
<i>Aeromonas caviae</i>	CHZ306	97.73	88.14
<i>Aeromonas caviae</i>	FDAARGOS_76	97.71	89.56
<i>Aeromonas caviae</i>	Ae398	97.68	89.59
<i>Aeromonas caviae</i>	YL12	97.66	90.36
<i>Aeromonas caviae</i>	A23	97.59	89.29
<i>Aeromonas caviae</i>	CECT 4221	97.56	85.67
<i>Aeromonas caviae</i>	VBF856	97.56	89

<i>Aeromonas sanarellii</i>	LMG 24682	89.8	79.71
<i>Aeromonas taiwanensis</i>	LMG 24683	89.18	79.08
<i>Aeromonas media</i>	WS	87.88	77.29
<i>Aeromonas dhakensis</i>	SSU	86.55	74.39
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	ATCC 7966	86.36	76.01
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ML09-119	86.11	76.52
<i>Aeromonas encheleia</i>	CECT 4342	85.57	75.94
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	CECT 4224	85.44	76.77
<i>Aeromonas aquatica</i>	AE235	85.4	75.48
<i>Aeromonas bestiarum</i>	GA97-22	84.93	74.09
<i>Aeromonas tecta</i>	CECT 7082	84.62	75.55
<i>Aeromonas piscicola</i>	LMG 24783	84.58	74.51
<i>Aeromonas popoffii</i>	CIP 105493	83.98	68.87
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	34mel	83.92	72.08
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	AS03	83.84	68.62
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> strain	RFAS1	83.82	71.63
<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	1999lcr	83.76	68.45
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	A449	83.75	72.49
<i>Aeromonas bivalvium</i>	CECT 7113	83.5	69.67

<i>Aeromonas veronii</i> biovar <i>sobria</i>	LMG 13067	83.44	68.31
<i>Aeromonas veronii</i> biovar <i>veronii</i>	CCM4359	83.43	67.13
<i>Aeromonas finlandiensis</i>	4287D	83.42	65.53
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	TTU2014-159ASC	83.36	69.38
<i>Aeromonas jandaei</i>	Riv2	83.36	68.34
<i>Aeromonas lacus</i>	AE122	83.33	67.13
<i>Aeromonas fluvialis</i>	LMG 24681	83.2	60.39
<i>Aeromonas australiensis</i>	CECT 8023	82.95	62.34
<i>Aeromonas sobria</i>	8005	82.46	65.48
<i>Aeromonas rivuli</i>	DSM 22539	80.89	66.79
<i>Aeromonas molluscorum</i>	848T	80.51	62.3
<i>Aeromonas cavernicola</i>	MDC 2508	78.77	50.54
<i>Aeromonas simiae</i>	CIP 107798	78.08	54.75
<i>Aeromonas diversa</i>	CDC 2478-85	77.93	53.66
<i>Aeromonas schubertii</i>	CECT 4240	77.91	56.29

5.3 Multilocus Sequence Analysis – MLSA

A análise filogenética foi inferida usando o método de *Neighbor joining* baseado no modelo em matriz Jukes Cantor. A árvore de consenso *bootstrap*, inferida a partir de 1000 repetições, representa a história evolutiva dos taxa analisados. Todas as posições com lacunas e dados em falta foram eliminadas. A análise envolveu sequências de aminoácidos de 53 genomas. Foram analisadas 5237 posições no conjunto final de dados. A árvore filogenética é mostrada na **Figura 3**.

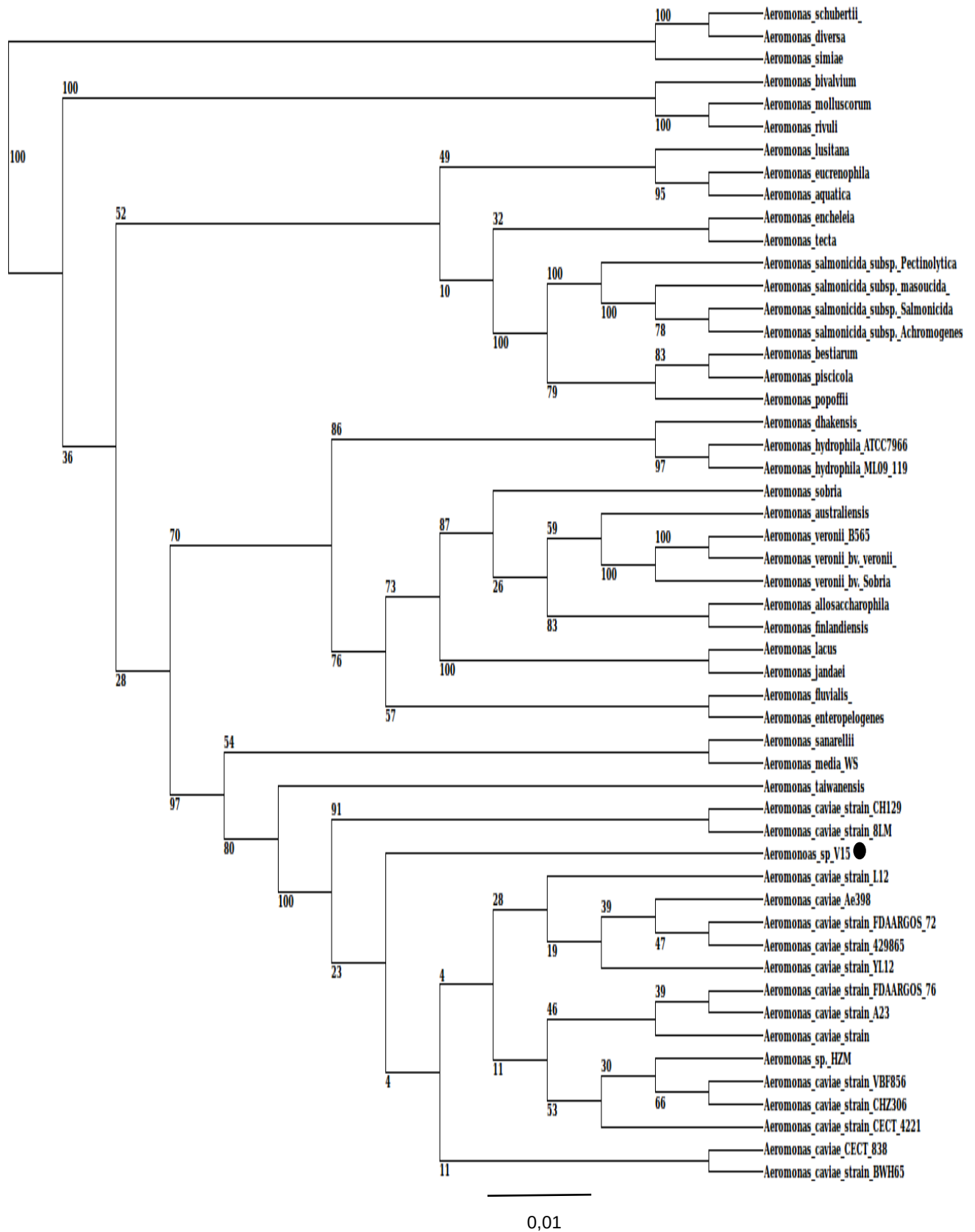


Figura 3 Árvore filogenética baseada a partir de 11 genes *housekeeping*, com os valores de *bootstrap*. *Aeromonas* sp V15 é marcada com uma esfera negra.

5.4 Genes de resistência a antibióticos

Foram identificados 11 genes que conferem resistência à antibióticos em *Aeromonas sp* V15, sendo três de genes que conferem resistência à antibióticos beta lactâmicos, cinco genes de resistência à antibióticos macrolídeos, dois genes de resistência aos antibióticos quinolonas. Na Tabela 3, são mostrados os antibióticos e os genes relacionados a resistência encontrados em *Aeromonas sp* V15, assim como os respectivos *locus tag*. Os valores de identidade e número de aminoácidos dos genes de resistência a antibióticos estão no **ANEXO 1**

Tabela 5 - Genes de resistência de à antibióticos encontrados em *Aeromonas sp* V15, assim como os seus respectivos produtos e *locus tag*.

Genes	Produtos	Locus tag
<i>cphA</i>	Beta-lactamase subclasse (cphA) parcial	648.104.peg.1629
<i>bla_{MOX6}</i>	Beta-lactamase de classe C (AmpC)	648.104.peg.1580
<i>bla_{OXA504}</i>	Beta-lactamase classe D	648.104.peg.2211
<i>macB</i>	Permease/ATP exportadora de macrolídeo MacB	648.104.peg.765
<i>macA</i>	Proteína de efluxo específica de macrolídeo MacA	648.104.peg.764
<i>macA</i>	Proteína de efluxo específica de macrolídeo MacA	648.104.peg.509
<i>macB</i>	Permease/ATP exportadora de macrolídeo MacB	648.104.peg.508
<i>opmH</i>	Canal de membrana exterior TolC	648.104.peg.3061
<i>qnrA</i>	Proteína Pentapeptídeo repetitivo família QnrA	648.104.peg.986
<i>parC</i>	DNA topoisomerase IV subunidade A (mutações)	648.104.peg.3072

Ao se realizar BLASTp, se observou que *bla_{OXA-504}* possui uma identidade de 88% com o gene *bla_{OXA-427}*. Na **Figura 9** são mostrados os alinhamentos das proteínas *bla_{OXA-504}* de *Aeromonas spp* V15 (648.104.peg.2211), com *bla_{OXA-427}* (ARO85965.1) de *Enterobacter cloacae* e a beta-lactamase AmpS (AHX63134.1) de *Aeromonas media* WS, pela ferramenta online Clustal Ômega (SIEVERS & HIGGINS, 2014) sendo a identidade de *bla_{OXA-504}* e *bla_{OXA-427}* de 89%.



Figura 4 – Alinhamento pelo Clustal Omêga da beta-lactamsase codificada pelo gene *bla_{oxa-504}* (648.104.peg.2211), de *Aeromonas sp.* V15, da beta-lactamsae codificada pelo gene *bla_{oxa-427}* (ARO85965.1) de *Enterobacter cloacae* e Amps (AHX63134.1) de *Aeromonas media* WS respectivamente. As regiões conservadas são representadas pelo asterisco, os dois pontos indicam a conservação de aminoácidos com propriedades fortemente similares e o ponto indica conservação entre grupos de propriedades fracamente similares

5.5 Ilhas genômicas

As ilhas genômicas no genoma de *Aeromonas sp* V15 foram preditas pelo software Gipsy versão 1.1.2, utilizando como referência a cepas *Aeromonas caviae* FDAARGOS 75. Ao todo foram identificadas 11 supostas ilhas genômicas, os resultados obtidos da análise de ilhas genômicas foram representados através da ferramenta DNAPlotter (CARVER *et al.*, 2009), como está representado na Figura 4.

Se nota que as ilhas estavam próximas de regiões de tRNA, e apresentam desvios do conteúdo GC.

Entre as supostas ilhas genômicas, apenas a ilha 11 foi classificada como ilha de resistência, para as ilhas 4 e 10, ocorreu uma sobreposição na classificação das ilhas genômicas, sendo a ilha 4 classificada como simbiótica e metabólica e a ilha 10 foi classificada como ilha simbiótica e de resistência. Para as demais ilhas nenhuma classificação foi definida. Na Tabela 5, são mostradas as supostas 11 ilhas identificadas no pseudogenoma de *Aeromonas sp* V15.

Tabela 6 - Ilhas genômicas encontradas no genoma de *Aeromonas sp* V15, assim como a localização de início e final dessas sequências no genoma de *Aeromonas sp* V15 tamanho, o número de CDS e as classes das ilhas.

GI	Início	Final	Tamanho (kb)	CDS	Classe
1	1016084	1026682	10.598	6	_____
2	1795616	1801122	5.506	5	_____
3	1814162	1825944	11.782	6	_____
4	1867571	1880633	13.062	12	Simbiótica/Metabólica
5	2083066	2120097	37.031	46	_____
6	2224023	2232758	8.735	9	_____
7	2738981	2745718	6.737	4	_____
8	2751404	2766342	14.937	10	_____
9	2770335	2782295	11.96	8	_____
10	2892786	2908758	8.84	16	Patogenicidade/Simbiótica
11	3157983	3166823	15.972	7	Resistência

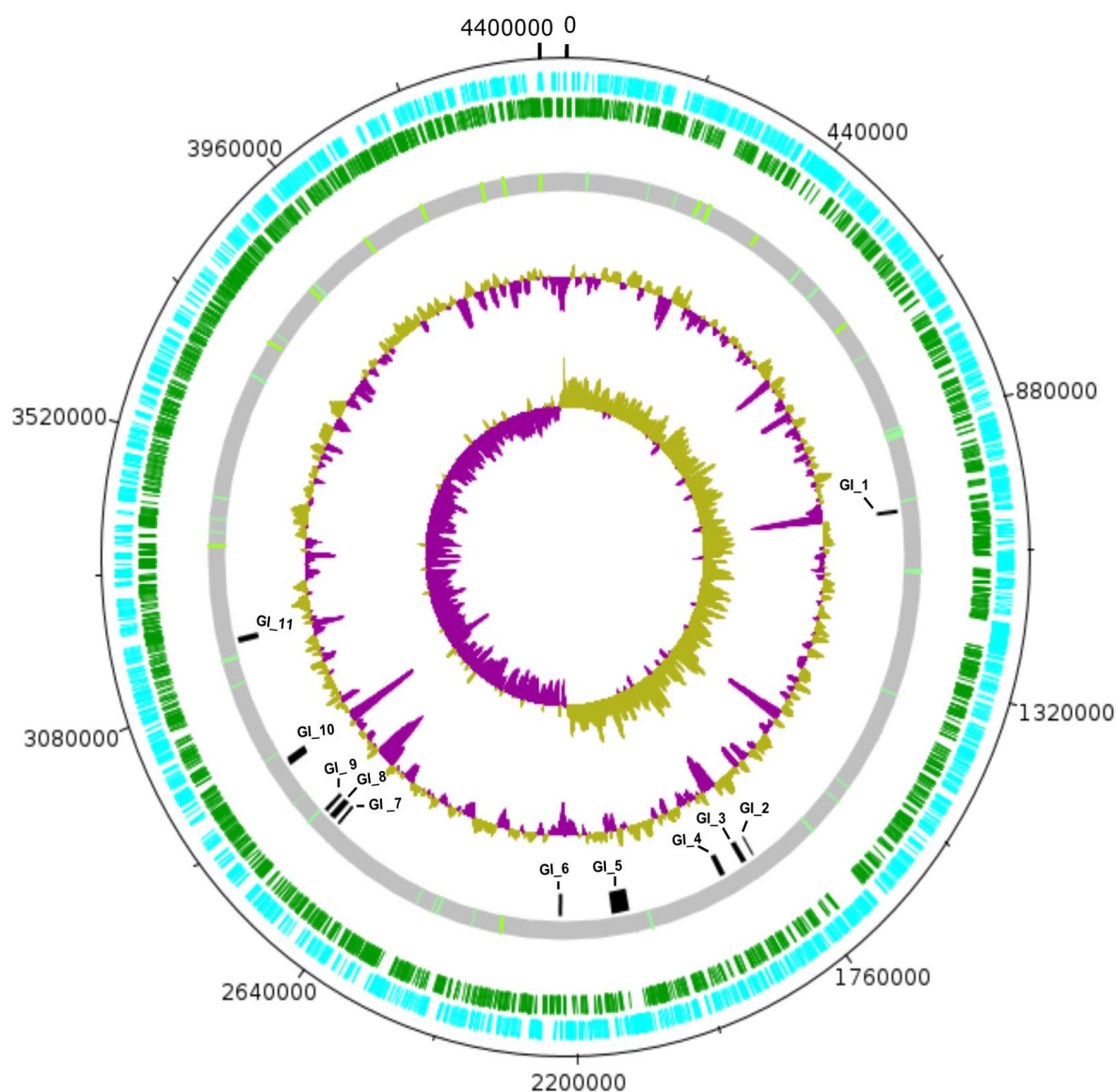


Figura 4 - Mapa circular do genoma de *Aeromonas sp V15* pelo DNA plotter. Partindo de dentro para fora, os dois círculos centrais representam o GC skew e o conteúdo de G + C, respectivamente. A linha de base no gráfico G + C representa o valor médio de 61,8%, sendo que os valores de G+C acima da média são representados pela cor bege e os valores abaixo são representados pela cor roxa. No círculo seguinte as onze ilhas gênicas (GI) são representadas pelos pinos de cor preta. No círculo cinza são mostrados os tRNA cor verde. Nos círculos mais externos as ORFs da fita negativa são representadas pela cor verde escuro e as ORFs da fita positiva são representadas pela cor azul claro e o círculo externo preto designa as posições, ao redor do genoma do genoma de *Aeromonas sp V15*.

Na ilha genômica 4, foi classificada como uma suposta ilha de metabólica e de simbiose. A anotação desta ilha, revelou que está ilha possui CDS genes envolvidos na biogênese de um transportador ABC de fosfonato (ORF 4.6 – ORF4.9), os quais foram e genes de catabolismo do fosfonato 2-aminoetilfosfônico (ORF 4.10 – ORF4.12). Os nomes dos genes da ilha se encontram no **ANEXO 2**

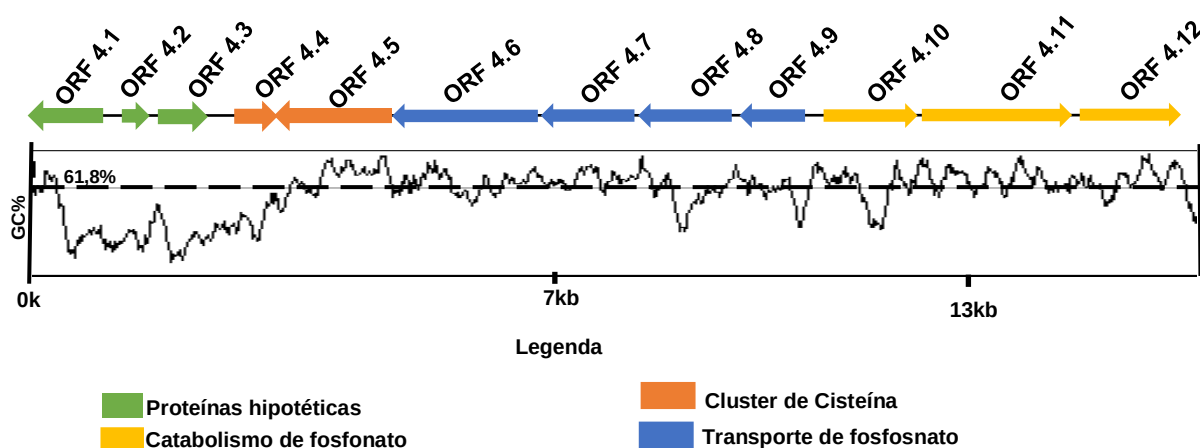


Figura 5 – Organização gênica da ilha genômica 4. Cada seta representa uma ORF, sendo que as setas em direção à direita, representam a fita positiva e as setas para a esquerda representam a fita negativa, abaixo é mostrado o gráfico de conteúdo G+C em percentual para a região onde está localizada a ilha, sendo que a linha preta tracejada mostra o valor de conteúdo G+C de todo o genoma de *Aeromonas sp* V15.

A ilha genômica 10, foi classificada como uma suposta ilha de patogenicidade e simbiose, esta ilha apresentou a um valor médio de GC menor que o genoma. Após a anotação desta ilha se observou que esta ilha possui as CDS que codificam a formação de uma cadeia de antígeno O. Os nomes dos genes da ilha se encontram no **ANEXO 2**

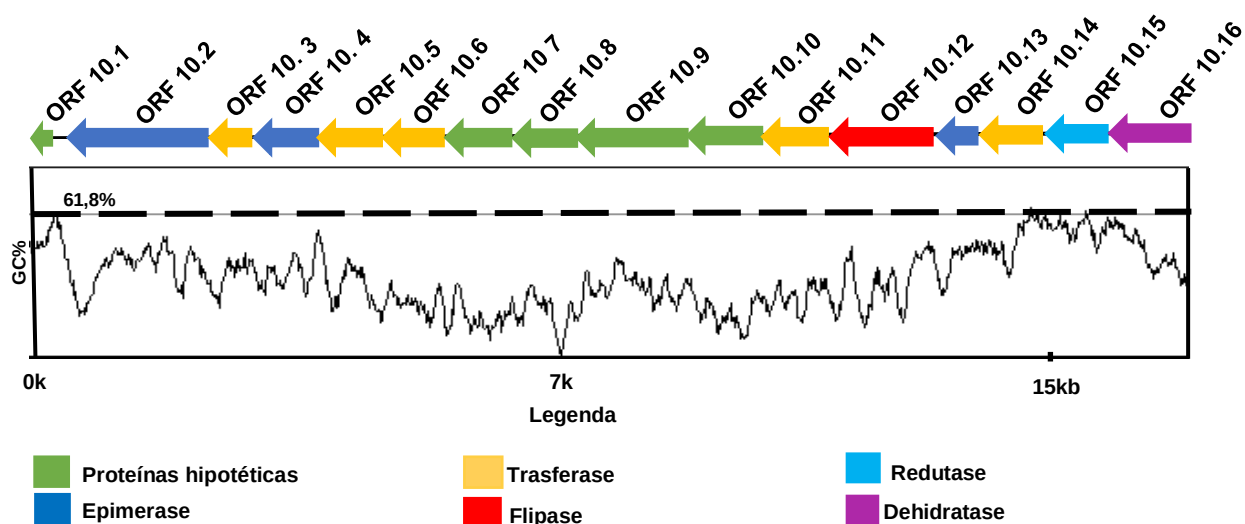


Figura 6 - Organização gênica da ilha genômica 10. Cada seta representa uma ORF, sendo que as setas em direção à direita, representam a fita positiva e as setas para a esquerda representam a fita negativa, abaixo é mostrado o gráfico de conteúdo G+C em percentual para a região onde está localizada a ilha, sendo que a linha preta tracejada mostra o valor de conteúdo G+C de todo o genoma de *Aeromonas sp* V15.

A ilha genômica 11, foi classificada como uma suposta ilha de resistência, esta ilha apresentou a um valor médio de GC menor que o genoma e a presença de transposases o que foi possível determinante para a classificação. Entre as CDS desta ilha há um gene de AcrB, que codifica um transportador de multidrogas de AcrAB. Os nomes dos genes da ilha se encontram no **ANEXO 2**

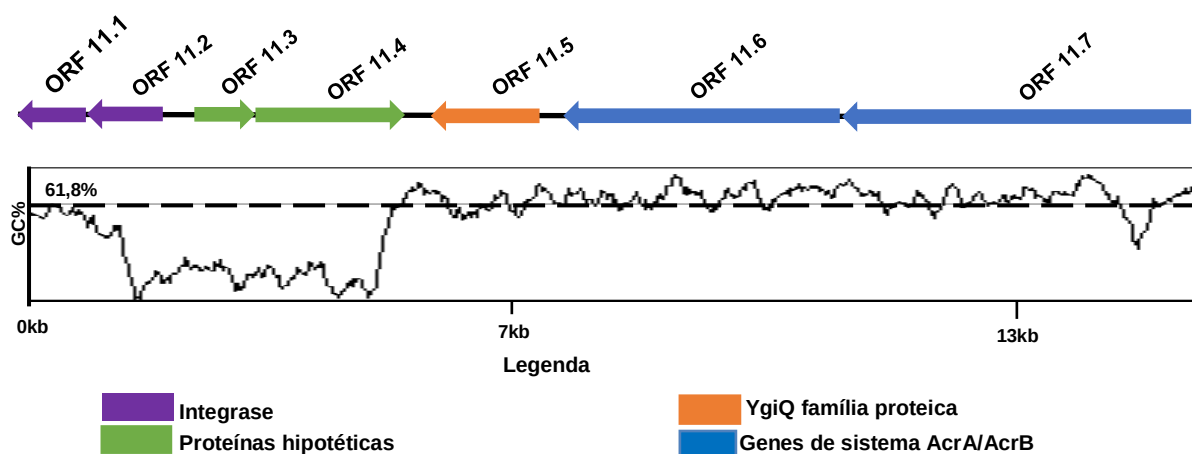
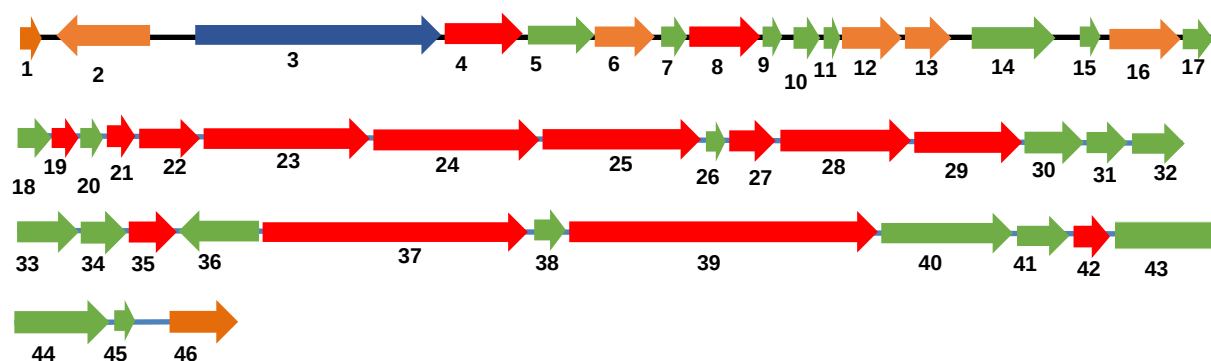


Figura 7 Organização gênica da ilha genômica 11. Cada seta representa uma ORF, sendo que as setas em direção à direita, representam a fita positiva e as setas para a esquerda representam a fita negativa, abaixo é mostrado o gráfico de conteúdo G+C em percentual para a região onde está localizada a ilha, sendo que a linha preta tracejada mostra o valor de conteúdo G+C de todo o genoma de *Aeromonas sp* V15.

A ilha genômica 5 não recebeu nenhuma classificação, porém com a utilização da ferramenta PHASTER foi determinada esta é uma provável região de prófago incompleta, sendo a maior ilha identificada com mais de 37kb contendo 44 CDS. Na **Figura 8** está representada a organização genômica da região. Os nomes dos genes da ilha se encontram no **ANEXO 2**



Legenda

Integrase
Proteínas hipotéticas

Genes estruturas virais
Proteínas regulatórias

Figura 8 - Organização gênica da ilha genômica 5. Cada seta representa uma ORF, assim como a sua localização na fita de DNA, sendo que as setas em direção à direita, representam a fita positiva e as setas para a esquerda representam a fita negativa.

5.6 Virulência

Na Tabela 4 são mostrados os genes associados a fatores de virulência presentes no genoma do *Aeromonas sp* V15 que apresentaram valores de identidade e de cobertura iguais ou maiores que 95%, e respectivos *locus tag* no genoma. Os nomes da proteína, nome do gene, número de aminoácidos e identidade dos respectivos fatores de virulência estão no **ANEXO 3**.

Tabela 7 - Fatores de virulência encontrados no genoma de *Aeromonas sp* V15 e os seus respectivos *locustag*

Fatores de Virulência	Locus tag
Sistemas de Secreção	
T2SS	648.104.peg.191- 648.104.peg.180
T6SS	648.104.peg.2530 - 648.104.peg.2552
Motilidade e adesão	

Flagelo polar	648.104.peg.1183 - 648.104.peg.1198
Flagelo lateral	648.104.peg.322 - 648.104.peg.360
Pili tipo IV (Msh)	648.104.peg.1411 - 648.104.peg.1392
Pili tipo IV (Tap)	648.104.peg.297 - 648.104.peg.1166
Toxinas	
Alt	648.104.peg.2038
Hemolisina (HlyA)	648.104.peg.1292
Hemolisina III	648.104.peg.4179
Enzimas	
Enolase (<i>Eno</i>)	648.104.peg.83
Exoribonuclease R (<i>vacB</i>)	648.104.peg.3237
Sideróforo	648.104.peg.1850 - 648.104.peg.1854

Na **Figura 9**, é mostrado o alinhamento das sequências de T6SS entre as cepas, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966, *Aeromonas sp* V15 e *Aeromonas dhakensis* SSU respectivamente. Neste gráfico os genes que compõem o cluster são representadas por barras, assim como os nomes dos respectivos genes estão acima destas barras, o gráfico de cor verde representa o perfil de identidade entre as três cepas, sendo que as setas azuis marcam as regiões conservadas entre as três cepas, por outro lado, as setas em vermelho são as regiões com baixo alinhamento ou baixa identidade entre as cepas, sendo regiões únicas de um genoma.

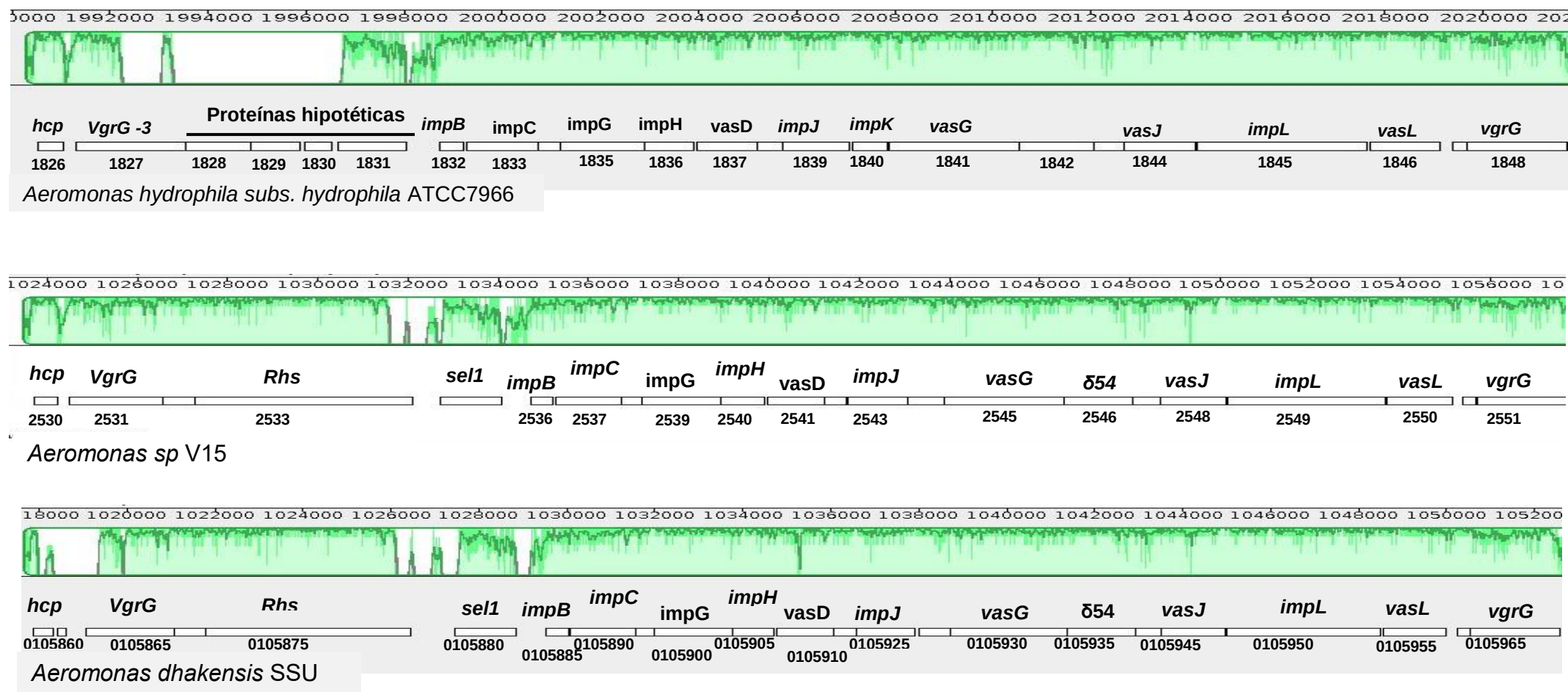


Figura 9 – Comparação da organização gênica de T6SS de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Aeromonas sp* V15 e *Aeromonas dhakensis* SSU.

6. DISCUSSÃO

6.1. Anotação do genoma de *Aeromonas sp V15*

Em relação aos resultados da anotação do genoma de *Aeromonas sp V15*, o conteúdo guanina citosina foi de 61.8%, este valor está dentro do que é observado no gênero *Aeromonas*, que varia entre 58% (LI *et al.*, 2011) a 62% (UHRYNOWSKI *et al.*, 2017). Foi observado uma grande quantidade de genes codificadores de tRNA, o que confirma a elevada atividade de síntese e exportação de enzimas observada nas espécies do gênero *Aeromonas* (KELLER *et al.*, 2004). A categorização dos genes presentes em *Aeromonas* demonstrou 503 genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos, seguidos dos genes envolvidos na metabolização de carboidratos (400) e por fim dos genes envolvidos em cofatores, vitaminas, grupo protético e pigmentos (273).

6.2. Similaridade entre genomas

6.2.1. Hibridização de DNA-DNA *in silico* (DDHis)

A análise DDHis tem sido aplicada com sucesso em importantes gêneros como *Escherichia* (MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2014), *Leptospira* (FOUTS *et al.*, 2016) e *Bacillus* (LIU *et al.*, 2015). Em relação ao gênero *Aeromonas*, o DDHis também foi empregado na diferenciação da cepa *Aeromonas salmonicida subsp. pectinolytica* 34mel com outras subespécies de *Aeromonas salmonicida* (PAVAN *et al.*, 2015). Além disso, o DDHis também foi utilizado em estudos taxonômicos para a comparação entre *Aeromonas media* e *Aeromonas rivipollensis*, permitindo a determinação de uma possível nova subespécie dentro de *Aeromonas media*. (TALAGRAND-REBOUL *et al.*, 2017).

Em relação aos resultados apresentados na **Tabela 3**, em que são mostrados os valores de DDHis de *Aeromonas sp V15* com as cepas de *Aeromonas* da **Tabela 1**, se observou que as cepas da espécie *Aeromonas caviae* e *Aeromonas sp HZM* apresentaram os maiores valores de DDHis, com valores variando entre 80% - 85%, paralelamente, o mesmo grupo de cepas também apresentou as menores distâncias intergenômicas entre 0.02176 - 0.0224.

Segundo MEIER-KOLTHOFF (2013) quando os valores de DDH's ultrapassam 70%, há uma indicação que as cepas analisadas podem pertencer à mesma espécie, uma vez que a metodologia empregada se baseia no mesmo conceito da técnica de hibridização DNA-DNA em laboratório, no qual considera o valor de 70% como o limite para a determinação de uma espécie. Deste modo, é pode se afirmar que *Aeromonas* sp V15 é uma espécie de *Aeromonas caviae*.

6.2.2. Identidade Média de Nucleotídeos (ANI)

O ANI é largamente aplicado em diferentes gêneros como *Bacillus* (DUNLAP *et al.*, 2015), *Enterobacter* (JACKSON *et al.*, 2016), *Nitrospira* (DAIMS *et al.*, 2015) e *Mycobacterium* (TORTOLI *et al.*, 2016). Em relação ao gênero *Aeromonas*, a utilização da identidade média do nucleotídeo foi aplicada na determinação de isolados de *Aeromonas salmonicida* e *Aeromonas moluscorum* e na identificação de novas espécies como *Aeromonas finlandiensis* e *Aeromonas lusitana* (RASMUSSEN-IVEY *et al.*, 2016; BEAZ-HIDALGO *et al.*, 2015). Além disso, COLSTON *et al.* (2014) utilizou o ANI em associação com a análise de MLSA e DDH's para a classificação taxonômica de 56 genomas de *Aeromonas*, sendo 33 genomas de *Aeromonas* sequenciados e mais 23 genomas depositados no banco de dados do GenBank, foi observado erros de identificação nas cepas depositadas no banco de dados e a identificação de uma provável nova espécie de *Aeromonas*.

Na **Tabela 4** são mostrados os resultados de ANI do *Aeromonas* sp V15 comparados com as cepas de *Aeromonas* da **Tabela 1**. As cepas que apresentaram os maiores valores de ANI maiores que 96%, foram das cepas de *Aeromonas caviae* e a cepa *Aeromonas* sp HZM, com valores entre 98.14% - 97.56%, além disso, estas cepas também apresentaram o maior percentual de alinhamento entre 92,53% e 89%.

Segundo RICHTER & ROSSELLÓ-MÓRA (2009) valores de ANI que refletem um grau de correspondência entre duas espécies são valores acima de 94%, este valor representa o mesmo valor limite de 70% utilizado para diferenciar duas espécies em análises de hibridização de DNA-DNA. No entanto, alguns autores utilizaram como limite de ANI valores entre 95% e 96% (GHATAK *et al.*, 2016; VINCENT *et al.*, 2016). Neste trabalho se utilizou como valor de limite de ANI o valor de 96%, uma vez que este valor foi empregado por COLSTON *et al.*, 2014 para a diferenciação de espécies

Aeromonas. Assim os valores de ANI que ultrapassaram 96% representam genomas de uma mesma espécie. Deste modo é pode se afirmar que *Aeromonas sp* V15 é uma espécie de *Aeromonas caviae*.

A cepa *Aeromonas sp* HZM também apresentou valores altos de DDHs e de ANI, semelhantes aos resultados observados nas cepas de *Aeromonas caviae*, sendo o valor de DDHs 97.76 e de ANI 82.6. Esses resultados indicam que essa cepa pertence à espécie *Aeromonas caviae*. Estes resultados demonstram que tanto DDHs como ANI são ferramentas úteis para evitar erros de afiliação taxonômica.

6.3. Multilocus Sequence Analysis – MLSA

Em relação ao gênero *Aeromonas* a análise de MLSA foi empregada tanto em isolados envolvidos em doenças em veterinárias (MARTINO *et al.*, 2011), assim como em isolados envolvidos em doenças em humanos (ROGER *et al.*, 2012). Na **Figura 3**, é mostrada a árvore de *multilocus*, em relação a cepa *Aeromonas sp* V15 se observou que esta se localiza no clado das espécies *Aeromonas caviae*, o que indica que a cepa é uma espécie de *Aeromonas caviae*, confirmando os resultados obtidos por DDHs e ANI. Ainda na árvore foi visto que *Aeromonas sp* V15 se encontra em um ramo próximo de *Aeromonas caviae* 8LM o qual é um isolado clínico, envolvido em diarreia aguda em crianças.

É observado uma proximidade filogenética entre *Aeromonas sp* V15 e as espécies *Aeromonas sanarellii* LMG 24682, *Aeromonas taiwanensis* LMG 24683 e *Aeromonas media* WS. Estes dados confirmam os resultados de DDHs e de ANI para as três respectivas cepas, uma vez que as três espécies apresentaram os maiores valores em ambas as análises, ao se desconsiderar as cepas de *Aeromonas caviae* e *Aeromonas sp* HZM, sendo respectivamente para *Aeromonas sanareli* LMG 24682 DDHs 40% e ANI 89.8%, para *Aeromonas taiwanensis* LMG 24683 DDHs 37.8% e ANI 89.18% e para *Aeromonas media* WS DDHs 34,6% e ANI 87,88%. Estes dados confirmam os resultados de MLSA obtidos por COLSTON *et al.* 2014 que observou uma proximidade filogenética do clado de *Aeromonas caviae* e as três espécies.

Mediante os resultados obtidos de MLSA, foi observado uma proximidade de *Aeromonas sp* V15 com as cepas *Aeromonas caviae* 8LM e *Aeromonas caviae*

CH129, além disso, também nos resultados de DDHs e ANI se observou que as cepas *Aeromonas caviae* 8LM e *Aeromonas caviae* CH129 apresentaram os maiores valores tanto de DDHs (85% e 83,5%) quanto de ANI (98,14% e 97,91%) respectivamente. A cepa *Aeromonas caviae* CH129 (CARDOZO *et al.*, 2016); é um isolado ambiental de trutas, por outro lado, a cepa *Aeromonas caviae* 8LM (MORIEL *et al.*, 2015) é um isolado clínico de coproculturas de um paciente que sofria diarreia, curiosamente, ambas as cepas são de origem brasileira, sendo *Aeromonas caviae* CH129 isolada no estado de São Paulo e *Aeromonas caviae* 8LM isolada no estado de Paraná.

6.4. Genes de resistência a antibióticos

Espécies resistentes à antibióticos são um desafio para o tratamento de infecções por *Aeromonas* e a água tem sido considerada um possível reservatório de genes de resistência (ZHANG *et al.*, 2009). A água clorada ou contaminada com xenobióticos, tanto exerce uma pressão seletiva para bactérias resistentes a antibióticos, como também, o ambiente aquático é um reservatório para o espalhamento de gene de resistência entre as bactérias, através de mecanismos de transferência horizontal de genes. (BAQUERO *et al.*, 2008; MANAIA *et al.*, 2016). A predição dos genes de resistência à antibióticos em *Aeromonas sp* V15 foi realizada pelo banco de dados PATRIC.

6.4.1. Genes de resistência a beta-lactâmicos

Em *Aeromonas sp* V15, foram encontrados genes que conferem resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, os quais foram os genes *cphA* que codifica a beta-lactamase subclasse B2 (648.104.peg.1629), o gene *bla_{MOX-6}* que codifica a beta-lactamase de classe C (648.104.peg.1580) e o gene *bla_{OXa-504}* que codifica a beta-lactamase de classe D (648.104.peg.2211). Certos genes de resistência à beta-lactâmicos estão relacionados a elementos móveis genéticos, como plasmídeos (FIGUEIRA *et al.*, 2011), transposases (PICÃO *et al.*, 2013) e integrons (IGBINOSA & OKOH, 2012), porém nenhum dos três genes encontrados estavam próximos de integrons, transposases ou de ilhas genômicas. CHEN *et al.* (2012) sugere que muitas espécies de *Aeromonas* podem produzir intrinsecamente beta-lactamases,.

As beta-lactamases de classe B são metalo-lactamase que necessitam de íons zinco ou outros cátions divalentes como cofator para a sua atividade catalítica (BERTONCHELI & HÖRNER, 2008). Em *Aeromonas sp* V15, foi identificado o gene *cphA* que codifica a beta-lactamase de classe B, pertencente a subclasse B2. A beta-lactamase de classe B é considerada uma enzima intrínseca do gênero *Aeromonas* sendo encontrada em variadas espécies como *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* e *Aeromonas dhakensis* (CHEN *et al.*, 2012). A beta-lactamase de classe B possui atividade em antibióticos carbapenêmicos e é inativa a penicilina e cefalosporinas (SEGATORE *et al.*, 1993; WU *et al.*, 2012;).

As beta-lactamases de classe C são serinas proteases, com capacidade de hidrolisar cefalosporinas, como também, são resistentes a certos inibidores de beta-lactamases como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (BUSH & JACOBY, 2010). Em *Aeromonas sp* V15 foi identificado o gene *bla_{MOX-6}*, o qual codifica AmpC uma beta-lactamase de classe C. O gene *bla_{MOX-6}* tem sido reportado em espécies de *Aeromonas caviae* resistentes a antibióticos, isoladas de pacientes com bacteremia (WU *et al.*, 2011). Clinicamente, os genes do tipo *bla_{MOX}* estão envolvidos na resistência de espécies *Aeromonas* a cefalosporinas, como ceftroxona, o qual é utilizado na prática clínica para o tratamento de gastroenterite causada por *Aeromonas* (KO *et al.*, 2001).

As beta-lactamases de classe D ou oxacilinases, possuem uma forte atividade hidrolítica contra oxacilina, por conta disto os membros desta família são denominados OXA (LEONARD, *et al.*, 2013). Como mostrado na **Figura 9** foi observado uma identidade significativa entre de *bla_{OXA-504}* e *bla_{OXA-427}*, sendo que *bla_{OXA-427}* é um gene presente em plasmídeos de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*. (DE LAVELEYE *et al.*, 2017; DESMET *et al.*, 2018). BOGAERTS *et al.*, (2017) clonou o gene *bla_{OXA-427}* em *Escherichia coli* e foi observado que o gene conferiu resistência às penicilinas, incluindo temocilina, ceftazidima e aztreonam.

6.4.2. Genes de resistência a macrolídeos

Em *Aeromonas sp* V15, foram encontrados o gene *opmH*, que codifica o canal de membrana exterior TolC e os genes *macA*, que codifica a proteína de efluxo específica de macrolídeo MacA, e o gene *macB*, que codifica a permease/ATP

exportadora de macrolídeo MacB, sendo que *macA* e *macB* estavam duplicados no genoma.

O complexo MacAB-TolC forma um transportador de efluxo do tipo ABC específico para macrolídeos (FITZPATRICK *et al.*, 2017). Este complexo foi identificado primeiramente em *Escherichia coli* (KOBAYASHI *et al.*, 2001), sendo observado que este complexo participa da translocação de fatores de virulência como a enterotoxina termoestável II (YAMANAKA *et al.*, 2008). Por outro lado, em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, MacAB-TolC desempenha um papel importante na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio.

Em *Aeromonas* o papel do complexo MacAB-TolC não foi estabelecido, no entanto, os genes *macA* e *macB* foram reportados também em duplicata, na cepa *Aeromonas salmonicida* CBA100 isolada de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), esta cepa apresentou uma sensibilidade intermediária a eritromicina, um antibiótico macrolídeo (VALDES *et al.*, 2015).

6.4.3. Genes de resistência a quinolona

Os mecanismos de resistência aos antibióticos quinolona podem ser mediados através de mutações em alvos de quinolona como DNA girase e a topoisomerase IV, como também a resistência pode ser mediada por plasmídeos incluindo as proteínas pentapeptídica do tipo qnr codificadas pelos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* e *qnrS* e pelo gene *aac(6)-IB-cr* (ARIAS *et al.*, 2010; WIMALASENA *et al.*, 2017). Em *Aeromonas sp* V15 foi encontrado mutações no gene *parC*, o qual codifica a subunidade A da topoisomerase IV, além disso, foi encontrado o gene *qnrB* que codifica o pentapeptídeo do tipo QnrB.

As mutações relatadas em ParC, em *Aeromonas sp* V15, são em Ser⁸⁰→Ile e Glu⁸⁴→Lys sendo observado a ocorrência destas mutações em espécies de *Aeromonas caviae* (GOÑI-URRIZA *et al.*, 2002; ALCAIDE *et al.*, 2010; FIGUEIRA *et al.*, 2011). Mutações em *parC* tanto estão associadas a cepas mais resistentes a (fluor)quinolonas como ácido nalixílico, ciprofloxacina e norflocacina (GOÑI-URRIZA *et al.*, 2002). O gene *qnrB* é um pentapeptídeo que protege tanto a DNA girase como ParC da ação da quinolona, aumentando ainda mais a resistência a quinolona. Mesmo

havendo poucos relatos de QnrB em *Aeromonas*, há depositado no banco de dados do Genbank, genes qnrB de espécies de *Aeromonas*, ao se realizar o BLAST de *Aeromonas sp* V15 contra essas sequências foi observado uma identidade de 89%, entre o *Aeromonas media* WS, um isolado ambiental.

6.5 Ilhas genômicas

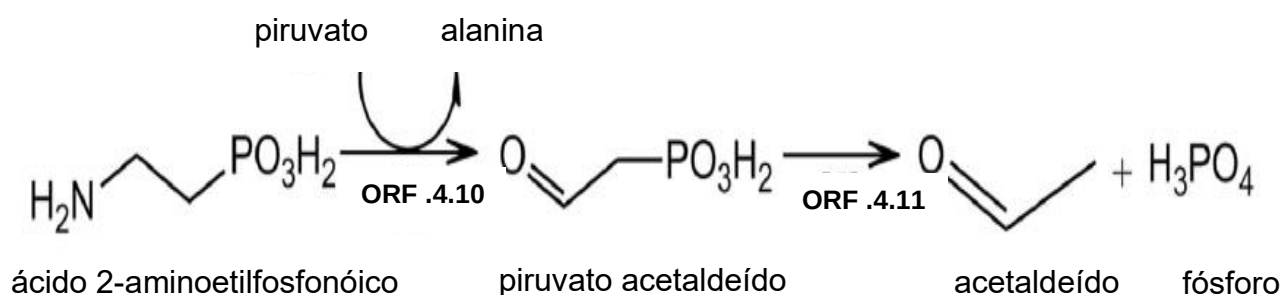
O estudo de ilhas genômicas é de grande relevância para a pesquisa biomédica e de bioinformática, através delas se pode compreender, por exemplo, as diferenças de patogenicidade entre duas cepas de uma mesma espécie (DANELISHVILI *et al.*, 2007), ou ainda o porquê de determinadas espécies sobreviverem em ambientes extremamente críticos enquanto outras não possuem esta capacidade (ARSÈNE-PLOETZE *et al.*, 2018); além disso, as ilhas genômicas podem ser utilizadas para entender as funcionalidades de uma bactéria e sua evolução genômica (HAWKEY *et al.*, 2018). Portanto, a identificação das ilhas genômicas representa uma das tarefas cruciais para a evolução do genoma e de estudos acerca dos mecanismos de transferência gênica (CHE *et al.*, 2014).

6.5.1. Ilhas genômica 4

A ilha genômica 4 foi classificada como uma suposta ilha metabólica e de simbiose, nesta ilha foi observado genes responsáveis pela obtenção e metabolização de ácido 2-aminoetilfosfônico. O ácido 2-aminoetilfosfônico, é um fosfonato de origem natural encontrado em protozoários, celenterados e moluscos, como também em compostos sintéticos (KONONOVA & NESMEYANOVA, 2002). Genes envolvidos na degradação de 2-aminoetilfosfônico foram identificados em *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 (SESHADRI *et al.*, 2006), no entanto, estes genes não foram reportados em espécies de *Aeromonas caviae*, por conta disto possivelmente foi considerado uma ilha genômica metabólica.

Em relação aos genes que compõem a ilha 4, foi observado a presença de genes codificantes para componentes de um transportador ABC especializado na captação de fosfonato (ORF 4.6 – 4.9) e genes codificantes para enzimas envolvidas no catabolismo de 2-aminoetilfosfônico (ORF 4.10 - 4.12). Na **Figura 9** são mostrados

os genes envolvidos no catabolismo de 2-aminoetilfosfônico, encontrados na ilha genômica 4.



ORF 4.10: 2-aminoetilfosfônico transaminase **ORF 4.11:** fosfonoacetaldeído hidrolase

Figura 99 Reação de catabolismo de ácido 2-aminoetilfosfônico.

A classificação dos genes da ilha genômica 4 como uma suposta ilha metabólica e de simbiose se justifica, tanto pelo fosfonato ser considerado uma fonte alternativa de fosfato, o que o configuraria como um metabólito secundário, como também, o metabolismo deste composto pode ser vantajoso para a sobrevivência e estabelecimento de *Aeromonas sp* V15 na água potável, visto que este ambiente é caracterizado por ser oligotrófico.

6.5.2. Ilhas genômica 10

A ilha genômica 10 foi classificada como uma suposta ilha de patogenicidade e de simbiose. A anotação desta ilha revelou genes codificantes de enzimas de transferência de carboidratos, além disso, um gene envolvido na síntese de flipase um componente do flagelo e nas margens desta ilha há um regulador de cadeia de antígeno O, logo possivelmente esta ilha pode ser um cluster de genes codificantes para componentes do O-antígeno. Segundo TABEL *et al.*, (2009) em *Aeromonas caviae* os genes envolvidos na glicosilação de LPS e flagelo são encontrados em ilhas genômicas de patogenicidade.

O antígeno-O é formado por cadeias repetitivas de glicanos compostas de homo ou de heteropolissacárideos que são um dos domínios que compõem o LPS. A composição química e estrutural, assim como, a antigenicidade do antígeno-O é extremamente variável, somente em *Aeromonas* foram descritos 1255 sorotipos de antígenos-O (THOMAS et al., 1990; MERINO et al., 2015). No entanto, em cepas de *Aeromonas* isoladas de infecções humanas, predominam os sorogrupos O:3, O:11, O:14, O:16 e O:34 (LOWRY et al., 2014).

A glicosilação de flagelos e LPS é de grande importância na patogenicidade de *Aeromonas*, MERINO et al, (2015) inativou genes envolvidos na glicosilação de flagelos e LPS em *Aeromonas hydrophila* AH3 e os comparou com isolados da cepa selvagens, sendo observado uma redução da adesão às células Hep-2 das estipes de mutantes para genes de glicosilação, assim como uma redução na formação de biofilme nessas cepas.

6.5.3. Ilhas genômica 11

A ilha 11 foi supostamente classificada como uma possível ilha de resistência. Entre os genes representativos presentes pela anotação da ilha, há um gene codificante para o transportador de efluxo multidrogas AcrB (ORF 11.6), duas transposases (ORF 11.1- ORF 11.2) e um gene para a subunidade adaptadora de transportador AcrA (ORF 11.6).

O complexo proteico AcrAB/TolC, formam uma bomba de efluxo de multidrogas do tipo ABC. Sendo que AcrB se encontra na membrana interna da bactéria e é o componente principal desta bomba de efluxo, participando da transdução de energia para AcrA da especificidade do substrato da bomba e o ancorador para a montagem dos outros dois componentes da bomba, no entanto, todos os três componentes são necessários para obter o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (EICHER et al., 2012).

6.5.4. Ilhas genômica 5

A ilha 5 não recebeu nenhuma classificação e através da anotação da ferramenta PHASTER foi considerada como uma suposta região incompleta de

prófago. Até a finalização do presente trabalho haviam sido depositados no banco de dados do Genbank, 15 genomas completos de fagos em isolados de *Aeromonas*, demonstrando como é largamente reportada a presença de fagos em *Aeromonas*. Segundo DZIEWIT & RADLINSKA (2016) a maioria dos prófagos encontrados em *Aeromonas* são pertencem à família *Myoviridae* como vírus semelhantes a P1-, P2- e T4-like, sendo apenas um relatado como pertencente à família *Podoviridae* (Kim *et al.*, 2012).

6.6. Virulência

Em relação aos genes associados a fatores de virulência encontrados em *Aeromonas sp* V15, foi observado genes envolvidos na adesão, motilidade, na síntese de toxinas, enzimas e sistema de secreção.

6.6.1. Motilidade e Adesão

A adesão da bactéria às células do hospedeiro é a etapa inicial do processo de infecção. Em *Aeromonas* as estruturas associadas a adesão são o pili do tipo IV, os flagelos polar e lateral (TÓMAS,2010). Em *Aeromonas sp* V15 foi encontrado genes associados a biogênese das três estruturas.

Em relação ao pili do tipo IV, foi observado genes associados a biogênese do sistema de pili Msh (648.104.peg.1411 - 648.104.peg.1392). O sistema Msh é formado por um cluster único com dezoito ORF's, como mostrado no **ANEXO 3**, sendo esta organização gênica encontrada em outras espécies de *Aeromonas*, como *Aeromonas veronii* biovar sobria e *Aeromonas hydrophila* (HADI *et al.*, 2012). O sistema Msh tem sido implicado como responsável pela adesão de *Aeromonas* no tecido do hospedeiro, durante os processos infecciosos (QIN *et al.*, 2014). HADI *et al.* (2012) inativou genes do *cluster* Msh de *Aeromonas veronii* biovar sobria, o que resultou em uma redução de 10 vezes ou mais na capacidade de aderência às células HEp-2, assim como na redução de formação de biofilme em vidro borossilicato.

Também foi encontrado o sistema de pili Tap em *Aeromonas sp* V15 (648.104.peg.297 - 648.104.peg.1166). O sistema Tap é formado por um cluster único de quatro ORF's, como mostrado no **ANEXO 3**, esta organização foi observada também em *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas veronii* biovar sobria (BARNETT &

KIROV, 1999) Embora a inativação do cluster *tapABCD* não cause efeito na aderência de *Aeromonas veronii* biovar. sobria de aderir a células HEp-2, o gene *tapD*, é essencial para o processamento das pseudopilinas do T2SS. Sendo observado que a inativação de *tapD* reduziu a secreção de fatores de virulência exportados via T2SS como proteases, hemolisina e DNase (KIROV *et al.*, 2000)

As espécies de *Aeromonas* mesofílicas apresentam um flagelo polar, como também apresentam flagelos laterais distribuídos aleatoriamente na superfície celular quando crescidos em superfícies sólidas ou ambientes viscosos (MERINO *et al.*, 2006). Em *Aeromonas sp* V15 foi encontrado *clusters* para a biogênese de flagelo polar e flagelo lateral.

Em *Aeromonas* o flagelo lateral está organizado em único *cluster* de 38 genes, distribuídos em seis *operons* como mostrado no **ANEXO 3**. O flagelo lateral desempenha um papel importante na adesão as células do hospedeiro e na formação de biofilme. JIANG *et al.* (2015) inativou genes envolvidos na biogênese de flagelo lateral e observou diminuição na motilidade adesão a células Hep-2.

O flagelo polar de *Aeromonas sp* V15 é semelhante ao observado por *Aeromonas hydrophila* AH-10, sendo organizado em cinco regiões cromossômicas contendo mais de 50 genes, como mostrado no **ANEXO 3** (CANALS *et al.*, 2006). O flagelo polar desempenha um papel relevante no processo de adesão e invasão na mucosa do hospedeiro. CANALS *et al.*, (2015) realizou mutações nos genes *flaAB*, *flaH*, *fliA*, *fliM*, *maf-1*, e *fliC* sendo observado, logo depois, a inativação do flagelo polar, a diminuição da aderência e da formação de biofilme.

6.6.2. Toxinas

É descrito que o gênero *Aeromonas* produz uma ampla gama de exotoxinas. Em relação aos genes que codificam exotoxinas presentes em *Aeromonas sp* V15, se observou genes que codificam a toxina Alt (648.104.peg.2038) a hemolisina hlyA (648.104.peg.1142) e a hemolisina III (648.104.peg.1648).

A toxina Alt é uma toxina citotônica que age sobre o epitélio aumentando os níveis de monofosfato adenosina cíclica (AMPc) e protangalinas, provocando a secreção de fluídos (TOMÁS, 2012). Esta toxina é encontrada em isolados de

Aeromonas envolvidos em gastroenterite (ALBERT *et al.*, 2000). Foi observado que a toxina Alt de *Aeromonas sp* V15 possui uma identidade com as toxinas de *Aeromonas caviae* 8lm ambos com a atividade de Alt comprovada experimentalmente.

A hemolisina HylA foi descrita primeiramente em *Aeromonas dhakensis* SSU sendo comprovada sua atividade hemolítica, entretanto, o papel desta hemolisina durante processo de infeccioso ainda não está bem estabelecido (EROVA *et al.*, 2007). A hemolisina III foi reportada em *Aeromonas hydrophila* ATCC7966, sendo observada uma semelhança com *Vibrio vulnificus* (SESHADRI *et al.*, 2006), no entanto, ainda é incerto o papel da enzima na patogenicidade, sendo necessária sua comprovação de atividade hemolítica.

6.6.3. Enzimas

O gênero *Aeromonas* secreta uma variedade de enzimas, embora essas enzimas não participem dos processos infecciosos diretamente, elas desempenham um papel na adaptação de *Aeromonas* ao ambiente (TOMÁS, 2012). Em *Aeromonas sp* V15 foram encontrados genes envolvidos na síntese de RnaseR, enolase e sideróforos.

O gene *vacB* sintetiza a enzima RnaseR uma exoribonuclease sendo considerada uma proteína *cold shock*, o qual permite o crescimento de *Aeromonas spp* em baixas temperaturas. Além disso, mutantes em *vacB* apresentam a motilidade reduzida e como consequência tem sua virulência reduzida (EROVA *et al.*, 2008).

O gene *eno* codifica a enzima enolase, o qual é expressa superficialmente em isolados de *Aeromonas dhakensis* implicados em diarreia (SHA *et al.*, 2009). A ação da enolase tem sido implicada nas etapas de invasão e colonização de *Aeromonas* no tecido do hospedeiro. Segundo SHA *et al.* (2009) a enolase se liga ao plasminogênio e facilita a sua conversão em plasmina, esta conversão permite a migração de *Aeromonas* dentro do hospedeiro para satisfazer suas demandas nutricionais.

A captação de ferro é uma etapa essencial para a sobrevivência da bactéria no hospedeiro. Em *Aeromonas sp* V15 foi observado genes associados à captação de ferro pelo sistema sideróforo (BATRA *et al.*, 2016). A inativação de *fur*, um regulador

da obtenção de ferro, provoca uma diminuição no crescimento de *Aeromonas hydrophila*, além disso, há uma repressão na transcrição da toxina citotóxica Act (SHA *et al.*, 2001).

6.6.4. Sistemas de Secreção

Em *Aeromonas sp* V15 foi observado genes associados a biogênese dos sistemas de secreção de T2SS e T6SS.

No gênero *Aeromonas* o T2SS está organizado em um cluster único de 15 genes, como mostrado no **ANEXO 3**, do qual doze genes formam o *core* deste sistema de secreção, são os genes *exeCDEFGIJKLMNO* (648.104.peg.191-648.104.peg.180). A translocação de proteína neste sistema de secreção é realizada através de dois passos sendo dependente da chaperona Sec (STROZEN *et al.*, 2011). O T2SS participa da exportação de enzimas patogênicas como aerolisinas, fosfolipase, proteases e DNases (EROVA *et al.*, 2006).

O T6SS está organizado em um único cluster de 18 genes, como mostrado no **ANEXO 3**. A inativação dos *vasH* e *δ54* de T6SS resultou em diminuição da atividade antifagocítica e atenuação virulência em um modelo de camundongo (SUAREZ *et al.*, 2010),

Suarez *et al.* (2008) observou que a organização gênica de T6SS em *Aeromonas dhakensis* SSU, um isolado envolvido em diarreia aguda e em *Aeromonas hydrophila* ATCC7966, um isolado ambiental, possuíam uma similaridade, no entanto, em *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 se verificou a presença de quatro genes que codificavam proteínas hipotéticas e que eram ausentes em *Aeromonas dhakensis* SSU. Em vista disso, se comparou a organização do *cluster* de T6SS de *Aeromonas sp* V15 com *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 e *Aeromonas dhakensis* SSU através do Mauve (DARLING *et al.*, 2004), uma ferramenta de alinhamento múltiplo entre genomas, permitindo a visualização de um *plote* de alinhamento entre as sequências. Como mostrado na **Figura 9**.

O gráfico mostra que a organização do T6SS se inicia semelhante entre as duas espécies com os genes *hcp* e *vgrG-3* presente nas três espécies. Além disso, há uma região conservada entre as três cepas após o gene *impB*, nesta região estão

os genes codificantes para a montagem do T6SS. No entanto, em *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 há uma divergência, pois, esta cepa possui quatro proteínas hipotéticas, o que confirma as observações de SUAREZ *et al.* (2008), estas proteínas hipotéticas estão ausentes em *Aeromonas dhakensis* SSU e *Aeromonas sp* V15, demonstrando uma organização gênica semelhante entre as duas cepas.

A importância de *Aeromonas sp* V15 possuir uma organização gênica de T6SS semelhante a *Aeromonas dhakensis* SSU, é de grande relevância para o entendimento dos fatores de virulência presentes nesta cepa, uma vez que o T6SS de *Aeromonas dhakensis* SSU foi testado experimentalmente e se mostrou ser fundamental para as infecções gastroentéricas causadas por esta cepa.

7. CONCLUSÕES

- O genoma da cepa *Aeromonas sp.* V15 foi determinado e anotado, sendo seu conteúdo GC de 61.8% e preditos ao todo 4.337 genes, com 4.028 CDS (regiões codificadoras de proteínas) e 144 genes de RNA estruturais (RNA ribossômico e RNA transportador).
- Os dados de DDH e ANI demonstraram que a cepa *Aeromonas sp.* V15 é uma espécie de *Aeromonas caviae*,
- Os dados de *multilocus* demonstraram que a *Aeromonas sp* V15 pertence ao clado das cepas de *Aeromonas caviae*, além disso, possui uma proximidade com isolados clínicos envolvidos em casos de gastroenterite.
- Em *Aeromonas sp* V15 também foi encontrado ilhas genômicas que conferem ilhas metabólicas que conferem capacidade de captação e metabolização de fosfonatos, ilha de patogenicidade para a biossíntese de antígeno O e ilha de resistência a multidrogas.
- Foram identificados pelo menos 9 genes que conferem resistência a antibióticos em *Aeromonas sp.* V15, sendo três genes que conferem resistência aos betas lactâmicos, cinco genes de resistência a antibióticos macrolídeos e dois genes de resistência aos antibióticos quinolonas.
- Em relação aos genes associados a fatores de virulência, foram observados genes envolvidos na adesão, motilidade, na síntese de toxinas, enzimas, e sistemas de secreção.
- A presença dos três pili e dos flagelos polar e lateral pode ser um indicativo de que a cepa *Aeromonas sp.* V15 é capaz de formar biofilmes e que provavelmente pode ter utilizado esta via para estar presente na água potável.

- Os resultados obtidos neste trabalho podem levar ao desenvolvimento de biomarcadores e a uma maior compreensão acerca da evolução, virulência, formação de biofilme e resistência a antibióticos em *Aeromonas spp.*

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, S. *et al.* The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2348–2357, jun. 2003.

ALBERT, M. J. *et al.* Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas spp.* isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3785–3790, out. 2000.

ALCAIDE, E.; BLASCO, M.-D.; ESTEVE, C. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 40–45, 1 jan. 2010.

ALI, A. *et al.* *Campylobacter fetus* subspecies: comparative genomics and prediction of potential virulence targets. **Gene**, v. 508, n. 2, p. 145–156, 25 out. 2012.

ALPERI, A. *et al.* *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a Spanish river. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. Pt 1, p. 72–77, jan. 2010.

ANTONOPOULOS, D. A. *et al.* PATRIC as a unique resource for studying antimicrobial resistance. **Briefings in Bioinformatics**, 31 jul. 2017.

ARIAS, A. *et al.* Molecular mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates of *Aeromonas caviae* and *Aeromonas veronii* biovar. *sobria*. **International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 135–141, set. 2010.

ARNDT, D. *et al.* PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W16-21, 08 2016.

ARSÈNE-PLOETZE, F. *et al.* Adaptation in toxic environments: comparative genomics of loci carrying antibiotic resistance genes derived from acid mine drainage waters. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 25, n. 2, p. 1470–1483, jan. 2018.

ASHBOLT, N. J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, Toxicology in the New Century, Opportunities and Challenges - Proceedings of the 5th Congress of Toxicology in Developing Countries. v. 198, n. 1, p. 229–238, 20 maio 2004.

AUCH, A. F. *et al.* Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. **Standards in Genomic Sciences**, v. 2, n. 1, p. 117–134, 28 jan. 2010.

AZZOPARDI, E. A. *et al.* Emerging gram-negative infections in burn wounds. **Journal of Burn Care & Research: Official Publication of the American Burn Association**, v. 32, n. 5, p. 570–576, out. 2011.

AZZOPARDI, E. A. *et al.* Gram Negative Wound Infection in Hospitalised Adult Burn Patients-Systematic Review and Metanalysis-. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95042, 21 abr. 2014.

BAQUERO, *et al.* Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 260–265, jun. 2008.

BARNETT, T. C.; KIROV, S. M. The type IV *Aeromonas* pilus (Tap) gene cluster is widely conserved in *Aeromonas* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 26, n. 2, p. 77–84, fev. 1999.

BARON, S. *et al.* *Aeromonas* Diversity and Antimicrobial Susceptibility in Freshwater—An Attempt to Set Generic Epidemiological Cut-Off Values. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

BATRA, P. *et al.* *Aeromonas spp.*: An Emerging Nosocomial Pathogen. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 8, n. 1, p. 1–4, jun. 2016a.

BEATSON, S. A. *et al.* Genome Sequence of the Emerging Pathogen *Aeromonas caviae*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 5, p. 1286–1287, mar. 2011.

BEAZ-HIDALGO, R. *et al.* *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 161–168, 1 maio 2015.

BELLO-ORTÍ, B. *et al.* Genome comparison of three serovar 5 pathogenic strains of *Haemophilus parasuis*: insights into an evolving swine pathogen. **Microbiology (Reading, England)**, v. 160, n. Pt 9, p. 1974–1984, set. 2014.

BERRY, J.-L. *et al.* A Comparative Structure/Function Analysis of Two Type IV Pilin DNA Receptors Defines a Novel Mode of DNA Binding. **Structure (London, England: 1993)**, v. 24, n. 6, p. 926–934, 07 2016.

BOGAERTS, P. *et al.* OXA-427, a new plasmid-borne carbapenem-hydrolysing class D beta-lactamase in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 9, p. 2469–2477, 1 set. 2017.

BOMO, A.-M. *et al.*. Detection, integration and persistence of aeromonads in water distribution pipe biofilms. **Journal of Water and Health**, v. 2, n. 2, p. 83–96, jun. 2004.

BOYD, J. M. *et al.* Contribution of Type IV Pili to the Virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Infection and Immunity**, v. 76, n. 4, p. 1445–1455, 4 jan. 2008.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of beta-Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, mar. 2010.

CANALS, R. *et al.* Analysis of the lateral flagellar gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 3, p. 852–862, fev. 2006b.

CANALS, R. *et al.* Polar flagellum biogenesis in *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 542–555, jan. 2006a

CARDOZO, F. A. *et al.* Draft Genome Sequence of *Aeromonas caviae* CH129, a Marine-Derived Bacterium Isolated from the Coast of São Paulo State, Brazil. **Genome Announcements**, v. 4, n. 6, p. e01336-16, 29 dez. 2016.

CARVER, T. *et al.* DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization., DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. **Bioinformatics (Oxford, England)**, **Bioinformatics**, v. 25, 25, n. 1, 1, p. 119, 119–120, 1 jan. 2009.

CEHOVIN, A. *et al.* Specific DNA recognition mediated by a type IV pilin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 8, p. 3065–3070, 19 fev. 2013.

CHAI, B *et al.*. Draft Genome Sequence of High-Melanin-Yielding *Aeromonas media* Strain WS. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 23, p. 6693–6694, dez. 2012.

CHAN, K.-G. *et al.* Draft Genome Sequence of *Aeromonas caviae* Strain L12, a Quorum-Sensing Strain Isolated from a Freshwater Lake in Malaysia. **Genome Announcements**, v. 3, n. 2, 5 mar. 2015.

CHAN, S. S. W. *et al.* Acute bacterial gastroenteritis: a study of adult patients with positive stool cultures treated in the emergency department. **Emergency medicine journal: EMJ**, v. 20, n. 4, p. 335–338, jul. 2003.

CHAO, C. M. *et al.* Pneumonia caused by *Aeromonas* species in Taiwan, 2004-2011. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1069–1075, ago. 2013b.

CHAO, C. M. *et al.* Skin and soft-tissue infections caused by *Aeromonas* species. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 543–547, abr. 2013a.

CHAURET, C. *et al.* Detection of *Aeromonas hydrophila* in a drinking-water distribution system: a field and pilot study. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 782–786, ago. 2001.

CHE, D. *et al.* Identifying pathogenicity islands in bacterial pathogenomics using computational approaches. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 1, p. 36–56, 13 jan. 2014.

CHEN, L. *et al.* VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Database issue, p. D325-328, 1 jan. 2005.

CHEN, P.-L. *et al.* A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* isolates in southern Taiwan: *A. dhakensis* is more predominant and virulent. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p. O428-434, jul. 2014.

CHEN, P.-L. *et al.* *Aeromonas* stool isolates from individuals with or without diarrhea in southern Taiwan: Predominance of *Aeromonas veronii*. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, v. 48, n. 6, p. 618–624, dez. 2015.

CHEN, P.-L. *et al.* Complexity of beta-lactamases among clinical *Aeromonas* isolates and its clinical implications. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 45, n. 6, p. 398–403, 1 dez. 2012.

CHEN, P.-L.; *et al.* *Aeromonas dhakensis*, an Increasingly Recognized Human Pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 793, 2016.

CHEUNG, M. K.; KWAN, H. S. Fighting outbreaks with bacterial genomics: case review and workflow proposal. **Public Health Genomics**, v. 15, n. 6, p. 341–351, 2012.

CHIBEU, A. *et al.* The adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage phiKMV is dependent on expression regulation of type IV pili genes. **FEMS microbiology letters**, v. 296, n. 2, p. 210–218, jun. 2009.

CHIM, H.; SONG, C. Aeromonas infection in critically ill burn patients. **Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 33, n. 6, p. 756–759, set. 2007.

CHOPRA, A. K. *et al.* Evidence for production of an enterotoxin and cholera toxin cross-reactive factor by *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 661–664, out. 1986.

CHOPRA, A. K.; HOUSTON, C. W. Enterotoxins in Aeromonas-associated gastroenteritis. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 13, p. 1129–1137, nov. 1999.

CHUA, P. *et al.* Genome sequencing and annotation of Aeromonas sp. HZM. **Genomics Data**, v. 5, p. 38–39, 19 maio 2015.

CHUANG, H.-C. *et al.* Different clinical characteristics among *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Aeromonas caviae* monomicrobial bacteremia. **Journal of Korean Medical Science**, v. 26, n. 11, p. 1415–1420, nov. 2011.

CLASEN, T. F. *et al.* Interventions to improve water quality for preventing diarrhoea. In: **The Cochrane Library**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2015.

CLAVIJO, A. P.; *et al.* The Longus type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) mediates bacterial self-aggregation and protection from antimicrobial agents. **Microbial Pathogenesis**, v. 48, n. 6, p. 230–238, jun. 2010.

COLSTON, S. M. *et al.* Bioinformatic Genome Comparisons for Taxonomic and Phylogenetic Assignments Using *Aeromonas* as a Test Case. **mBio**, v. 5, n. 6, p. e02136-14, 31 dez. 2014.

CRISTINA DALL' ACQUA, F. Análise por sequências multilocus de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. Dissertação - São Paulo: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO", dez. 2011.

DAIMS, H. *et al.* Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 504–509, dez. 2015.

DANAHER, P. J.; MUELLER, W. P. *Aeromonas hydrophila* septic arthritis. **Military Medicine**, v. 176, n. 12, p. 1444–1446, dez. 2011.

DANELISHVILI, L. *et al.* Identification of *Mycobacterium avium* pathogenicity island important for macrophage and amoeba infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 26, p. 11038–11043, 26 jun. 2007.

DE LAVELEYE, M. *et al.* Increasing incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Belgian hospitals. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 139–146, jan. 2017.

DESMET, S. *et al.* Antibiotic Resistance Plasmids Cointegrated into a Megaplasmid Harboring the blaOXA-427 Carbapenemase Gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 3, mar. 2018.

DIAZ, J. H. Skin and soft tissue infections following marine injuries and exposures in travelers. **Journal of Travel Medicine**, v. 21, n. 3, p. 207–213, jun. 2014.

DOBRINDT, U. *et al.* Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 414–424, maio 2004.

DRYDEN, M.; MUNRO, R. *Aeromonas* septicemia: relationship of species and clinical features. **Pathology**, v. 21, n. 2, p. 111–114, abr. 1989.

DUNLAP, C. A. *et al.* Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2104–2109, 2015.

DZIEWIT, L.; RADLINSKA, M. Two novel temperate bacteriophages co-existing in *Aeromonas* sp. ARM81 - characterization of their genomes, proteomes and DNA methyltransferases. **The Journal of General Virology**, v. 97, n. 8, p. 2008–2022, ago. 2016.

EASOW, J. M.; TULADHAR, R. *Aeromonas hydrophila* wound infection following a tiger bite in Nepal. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 38, n. 5, p. 867–870, set. 2007.

EGOROV, A. I. *et al.* Occurrence of *Aeromonas* spp. in a random sample of drinking water distribution systems in the USA. **Journal of Water and Health**, v. 9, n. 4, p. 785–798, dez. 2011.

EICHER, T. *et al.* Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 15, p. 5687–5692, 10 abr. 2012.

EROVA, T. E. *et al.* Cold Shock Exoribonuclease R (VacB) Is Involved in *Aeromonas hydrophila* Pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 10, p. 3467–3474, maio 2008.

EROVA, T. E. *et al.* DNA adenine methyltransferase (Dam) controls the expression of the cytotoxic enterotoxin (act) gene of *Aeromonas hydrophila* via tRNA modifying enzyme-glucose-inhibited division protein (GidA). **Gene**, v. 498, n. 2, p. 280–287, 1 maio 2012.

EROVA, T. E. *et al.* Identification of a new hemolysin from diarrheal isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*. **FEMS microbiology letters**, v. 275, n. 2, p. 301–311, out. 2007.

ESSERS, B. *et al.* Acute community-acquired diarrhea requiring hospital admission in Swiss children. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31, n. 1, p. 192–196, jul. 2000.

FADL, A. A. *et al.* Deletion of the genes encoding the type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alters host responses to *Aeromonas hydrophila* infection. **Microbial Pathogenesis**, v. 40, n. 5, p. 198–210, 1 maio 2006.

FALKINHAM, J. O. Common features of opportunistic premise plumbing pathogens. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 12, n. 5, p. 4533–4545, 24 abr. 2015.

FALKINHAM, J. O. *et al* Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: Increasingly Important Pathogens in Drinking Water. *Pathogens*, v. 4, n. 2, p. 373–386, 9 jun. 2015.

FARFÁN, M. *et al*. Draft Genome Sequence of the *Aeromonas diversa* Type Strain. **Genome Announcements**, v. 1, n. 3, 27 jun. 2013.

FERGUSON, M. R. *et al*. Hyperproduction, purification, and mechanism of action of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 10, p. 4299–4308, out. 1997.

FERNÁNDEZ, M. C. *et al*. *Aeromonas hydrophila* and its relation with drinking water indicators of microbiological quality in Argentina. **Genetica**, v. 108, n. 1, p. 35–40, 2000.

FEWTRELL, L. *et al*. Water, sanitation, and hygiene interventions to reduce diarrhoea in less developed countries: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 42–52, 1 jan. 2005.

FIGUEIRA, V. *et al*. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas spp.* in drinking and waste water treatment plants. **Water Research**, v. 45, n. 17, p. 5599–5611, 1 nov. 2011.

FINKELSTEIN, R.; OREN, I. Soft tissue infections caused by marine bacterial pathogens: epidemiology, diagnosis, and management. **Current Infectious Disease Reports**, v. 13, n. 5, p. 470–477, out. 2011.

FITZPATRICK, A. W. P. *et al.* Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 17070, 15 maio 2017.

FLEISCHMANN, R. D. *et al.* Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 496–512, 28 jul. 1995.

FLEMMING, H.-C.; *et al.* Contamination potential of biofilms in water distribution systems. **Water Science and Technology: Water Supply**, v. 2, n. 1, p. 271–280, 1 jan. 2002.

FOUTS, D. E. *et al.* What Makes a Bacterial Species Pathogenic?:Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004403, 18 fev. 2016.

GALARDINI, M *et al.* Mapping contigs using CONTIGuator. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1231, p. 163–176, 2015.

GAVÍN, R. *et al.* Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 383–397, jan. 2002.

GHATAK, S. *et al.* Pan-genome analysis of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* and *Aeromonas caviae* indicates phylogenomic diversity and greater pathogenic potential for *Aeromonas hydrophila*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 109, n. 7, p. 945–956, jul. 2016.

GHENGHESH, K. S. *et al.* *Aeromonas*-associated infections in developing countries. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 2, p. 81–98, 1 abr. 2008.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 237–245, jun. 2015.

GOÑI-URRIZA, M. *et al.* Type II topoisomerase quinolone resistance-determining regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, and *A. sobria* complexes and mutations associated with quinolone resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 350–359, fev. 2002.

GORIS, J. *et al.* DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. Pt 1, p. 81–91, jan. 2007.

GRANDJEAN, D. *et al.* Iron uptake is essential for *Escherichia coli* survival in drinking water. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 111–117, jul. 2006.

GRANT, J. R.; STOTHARD, P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Web Server issue, p. W181-184, 1 jul. 2008.

HADI, N. *et al.* Bundle-forming pilus locus of *Aeromonas veronii* biovar. *Sobria*. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 4, p. 1351–1360, abr. 2012.

HAFT, D. H. Using comparative genomics to drive new discoveries in microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, Host–microbe interactions: bacteria • Genomics. v. 23, p. 189–196, 1 fev. 2015.

HAN, J. E. *et al.* Draft Genome Sequence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* AS03, an Atypical Strain Isolated from Crucian Carp (*Carassius carassius*) in the Republic of Korea. **Genome Announcements**, v. 1, n. 5, 3 out. 2013.

HAVELAAR, A. H. *et al.* The presence of *Aeromonas* in drinking water supplies in The Netherlands. **Zentralblatt Fur Hygiene Und Umweltmedizin = International Journal of Hygiene and Environmental Medicine**, v. 190, n. 3, p. 236–256, set. 1990.

HAWKEY, J. *et al.* Evolution of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* during a prolonged infection. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 3, 16 mar. 2018.

HIRANSUTHIKUL, N. *et al.* Skin and Soft-Tissue Infections among Tsunami Survivors in Southern Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 10, p. e93–e96, 15 nov. 2005.

HOFER, E. *et al.* *Aeromonas* associated with an acute diarrhea outbreak in São Bento do Una, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 217–220, abr. 2006.

HOSSAIN, M. J. *et al.* Draft Genome Sequences of Two Novel *Aeromonas* Species Recovered in Association with Cyanobacterial Blooms. **Genome Announcements**, v. 2, n. 6, 20 nov. 2014.

IGBINOSA, I. H. *et al.* Emerging *Aeromonas* Species Infections and Their Significance in Public Health. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–13, 4 jun. 2012.

ISSA, N.; NAPOLITANO, L. M. *Aeromonas* pneumonia in a trauma patient requiring extracorporeal membrane oxygenation for severe acute respiratory distress syndrome:

case report and literature review. **Surgical Infections**, v. 12, n. 3, p. 241–245, jun. 2011.

JACKSON, E. E. *et al.* Draft Genome Sequence of an *Enterobacter* Species Associated with Illnesses and Powdered Infant Formula. **Genome Announcements**, v. 4, n. 1, p. e01479-15, 25 fev. 2016.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35–73, jan. 2010.

JIANG, X. *et al.* FlgN plays important roles in the adhesion of *Aeromonas hydrophila* to host mucus. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 14, n. 2, p. 6376–6386, 11 jun. 2015.

JONES, C. L. *et al.* Fatal outbreak of an emerging clone of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* with enhanced virulence. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 61, n. 2, p. 145–154, 15 jul. 2015.

JORGE, M. T. *et al.* *Aeromonas hydrophila* soft-tissue infection as a complication of snake bite: report of three cases. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 92, n. 2, p. 213–217, 1 mar. 1998.

JORGE, M. T. *et al.* Failure of chloramphenicol prophylaxis to reduce the frequency of abscess formation as a complication of envenoming by *Bothrops* snakes in Brazil: a double-blind randomized controlled trial. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 9, p. 529–534, set. 2004.

JUHAS, M. *et al.* Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 376–393, 1 mar. 2009.

KALI, A. *et al.* *Aeromonas hydrophila* meningitis and fulminant sepsis in preterm newborn: A case report and review of literature. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 544–547, dez. 2016.

KATZ, M. J. *et al.* Recurrent *Aeromonas* Bacteremia Due to Contaminated Well Water. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, 20 out. 2015.

KELLER, T. *et al.* A secreted metallo protease from *Aeromonas hydrophila* exhibits prothrombin activator activity. **Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis**, v. 15, n. 2, p. 169–178, mar. 2004.

KIENZLE, N. *et al.* *Aeromonas* wound infection in burns. **Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 26, n. 5, p. 478–482, ago. 2000.

KIM, S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage PA1Ø requires type IV pili for infection and shows broad bactericidal and biofilm removal activities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 17, p. 6380–6385, set. 2012.

KIMURA, M.; *et al.* *Aeromonas caviae* is the most frequent pathogen amongst cases of *Aeromonas* bacteremia in Japan. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 45, n. 4, p. 304–309, abr. 2013.

KIROV, S. M. *et al.* Investigation of the Role of Type IV *Aeromonas* Pilus (Tap) in the Pathogenesis of *Aeromonas* Gastrointestinal Infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4040–4048, 7 jan. 2000.

KIROV, S. M. *et al* Aeromonas Flagella (Polar and Lateral) Are Enterocyte Adhesins That Contribute to Biofilm Formation on Surfaces. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 1939–1945, 4 jan. 2004.

KO, W. C. *et al.* et al. Clinical features and therapeutic implications of 104 episodes of monomicrobial Aeromonas bacteraemia. **The Journal of Infection**, v. 40, n. 3, p. 267–273, maio 2000.

KOBAYASHI, N.; *et al.* Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 19, p. 5639–5644, out. 2001.

KONONOVA, S. V.; NESMEYANOVA, M. A. Phosphonates and their degradation by microorganisms. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 67, n. 2, p. 184–195, fev. 2002.

KOROTKOV, K. V.; *et al.* SANDKVIST, M.; HOL, W. G. J. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 336–351, 2 abr. 2012.

KUMAR, M. R.; *et al.* Aeromonas species isolated from a case of meningitis. **Indian Journal of Pathology & Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 521–522, set. 2014.

KWONG, J. C. *et al.* Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. **Pathology**, v. 47, n. 3, p. 199–210, abr. 2015.

LAI, C.-C. *et al.* *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* bacteremia: rare pathogens of infection in a burn patient. **Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 33, n. 2, p. 255–257, mar. 2007.

LANGILLE, M. G. I.; *et al.*. Detecting genomic islands using bioinformatics approaches. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 373–382, 2010.

LARSEN, M. V. *et al.* Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1355–1361, 4 jan. 2012.

LEONARD, D. A.; BONOMO, R. A.; POWERS, R. A. Class D beta-lactamases: a reappraisal after five decades. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 11, p. 2407–2415, 19 nov. 2013.

LI, F. *et al.* Distribution, virulence-associated genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolates from diarrheal patients and water, China. **The Journal of Infection**, v. 70, n. 6, p. 600–608, jun. 2015.

LI, Y. *et al.* Complete Genome Sequence of *Aeromonas veronii* Strain B565[▼]. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 13, p. 3389–3390, jul. 2011.

LIU, Y. *et al.* Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. **Scientific Reports**, v. 5, p. 14082, 16 set. 2015.

LLOPIS, F. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of bacteraemia caused by *Aeromonas* spp. as compared with *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 36, n. 5, p. 335–341, 2004.

LOWRY, R. *et al.* *Aeromonas* flagella and colonisation mechanisms. **Advances in Microbial Physiology**, v. 65, p. 203–256, 2014.

LU, B.; LEONG, H. W. Computational methods for predicting genomic islands in microbial genomes. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 14, p. 200–206, 2016.

MAIER, B.; WONG, G. C. L. How Bacteria Use Type IV Pili Machinery on Surfaces. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 12, p. 775–788, dez. 2015.

MANAIA, C. M. *et al.* Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1543–1557, fev. 2016.

MANCHAK, J.; *et al.* Mutational analysis of F-pilin reveals domains for pilus assembly, phage infection and DNA transfer. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 195–205, jan. 2002.

MANNA, S. K. *et al.* Occurrence and virulence characteristics of *Aeromonas* species in meat, milk and fish in India. **Journal of Food Safety**, v. 33, n. 4, p. 461–469, 2013.

MARKOV, G. *et al.* Necrotizing Fasciitis and Myonecrosis Due to *Aeromonas hydrophila*. **Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice**, v. 19, n. 8, p. 223–226, ago. 2007.

MARTI, E.; BALCÁZAR, J. L. *Aeromonas rivipollensis* sp. nov., a novel species isolated from aquatic samples. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 1435–1439, dez. 2015.

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S. W. *Aeromonas*. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2015.

MARTINEZ-MURCIA, A. J. et al. Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 189–199, maio 2011.

MARTINO, M. E. et al. Determination of Microbial Diversity of *Aeromonas* Strains on the Basis of Multilocus Sequence Typing, Phenotype, and Presence of Putative Virulence Genes ▽. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 14, p. 4986–5000, jul. 2011.

MCADAM, P. R.; et al. High-throughput sequencing for the study of bacterial pathogen biology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 19, n. 100, p. 106–113, jun. 2014.

MCARTHUR, A. G. et al. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3348–3357, jul. 2013.

MCARTHUR, A. G. et al. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC.00419-13, 6 maio 2013.

MEDIHALA, P. G. et al. Effect of pumping on the spatio-temporal distribution of microbial communities in a water well field. **Water Research**, v. 46, n. 4, p. 1286–1300, 15 mar. 2012.

MERINO, S.; et al. Role of *Aeromonas hydrophila* flagella glycosylation in adhesion to Hep-2 cells, biofilm formation and immune stimulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 21935–21946, 28 nov. 2014.

MERINO, S.; *et al.* The Polymerization of *Aeromonas hydrophila* AH-3 O-Antigen LPS: Concerted Action of WecP and Wzy. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0131905, 10 jul. 2015.

MIYAGI, K.; *et al.* Sanitary evaluation of domestic water supply facilities with storage tanks and detection of *Aeromonas*, enteric and related bacteria in domestic water facilities in Okinawa Prefecture of Japan. **Water Research**, v. 119, p. 171–177, 01 2017.

MONAGHAN, S. F. *et al.* Necrotizing fasciitis and sepsis caused by *Aeromonas hydrophila* after crush injury of the lower extremity. **Surgical Infections**, v. 9, n. 4, p. 459–467, ago. 2008a.

MORIEL, B. **Sequenciamento e comparação do genoma de *Aeromonas caviae* 8LM**. Tese—Curitiba: Universidade Federal do Paraná, jul. 2017.

MORIEL, B. *et al.* Draft Genome Sequence of *Aeromonas caviae* 8LM, Isolated from Stool Culture of a Child with Diarrhea. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, p. e00524-15, 25 jun. 2015.

MUKHOPADHYAY, C. *et al.* Emerging extra-intestinal infections with *Aeromonas hydrophila* in coastal region of southern Karnataka. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 54, n. 3, p. 199–202, set. 2008.

NOJIMOTO, I. T. *et al.* The prevalence of *Aeromonas spp.* in the diarrheal feces of children under the age of 5 years in the city of Goiânia, Goiás in the 1995-1996 biennium. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 30, n. 5, p. 385–388, out. 1997.

NWACHCUKU, N.; GERBA, C. P. Emerging waterborne pathogens: can we kill them all? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 175–180, 1 jun. 2004.

OCHMAN, H.; *et al.* Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, n. 6784, p. 299–304, maio 2000.

OJEDA-VARGAS, M *et al.* Urinary tract infection caused by bacteria of the genus *Aeromonas*. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 23, n. 3, p. 181–182, mar. 2005.

OTT, B. M. *et al.* A Tale of Transmission: *Aeromonas veronii* Activity within Leech-Exuded Mucus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 9, p. 2644–2655, maio 2016.

OXARAN, V. *et al.* Pilus biogenesis in *Lactococcus lactis*: molecular characterization and role in aggregation and biofilm formation. **PloS One**, v. 7, n. 12, p. e50989, 2012.

PABLOS, M. *et al.* Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 3, p. 203–210, 30 jun. 2011.

PABLOS, M. *et al.* Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 2, p. 158–164, 31 out. 2009.

PADILLA, J. C. A. *et al.* *et al.* Draft Genome Sequence of *Aeromonas caviae* Strain 429865 INP, Isolated from a Mexican Patient. **Genome Announcements**, v. 3, n. 5, 22 out. 2015.

PAMPÍN, F *et al.* *Aeromonas* and meningitis: An unusual presentation. **Neurocirugia (Asturias, Spain)**, v. 23, n. 5, p. 200–202, set. 2012.

PANG, M. *et al.* Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics. **Scientific Reports**, v. 5, p. 9833, 27 maio 2015.

PAVAN, M. E. *et al.* Genome Sequence of the Melanin-Producing Extremophile *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* Strain 34meIT. **Genome Announcements**, v. 1, n. 5, 12 set. 2013.

PAVAN, M. E. *et al.* Living in an Extremely Polluted Environment: Clues from the Genome of Melanin-Producing *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* 34meIT. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 15, p. 5235–5248, 8 jan. 2015.

PEPE, C. M.; *et al.* Cloning of an *Aeromonas hydrophila* type IV pilus biogenesis gene cluster: complementation of pilus assembly functions and characterization of a type IV leader peptidase/N-methyltransferase required for extracellular protein secretion. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 857–869, fev. 1996.

PERCIVAL, S. L.; WILLIAMS, D. W. Chapter Three - *Aeromonas*. In: **Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)**. London: Academic Press, 2014. p. 49–64.

PEREIRA, C. S. *et al.* *Aeromonas spp.* e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (Perna perna) in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. **Food Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 562–566, dez. 2004.

PEREIRA, C. S. *et al.* Characterization of *Aeromonas spp* isolates from newborns hospitalized. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 179–182, abr. 2008.

PÉREZ-LOSADA, M.; *et al.* Microbial sequence typing in the genomic era. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, 21 set. 2017.

PICÃO, R. C. *et al.* The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas spp.* and *Enterobacteriaceae* in sewage. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 1, p. 80–85, 1 maio 2013.

PNUMA. A Snapshot of the World's water quality : towards a global assessment. In: Nairobi, Quenia: 2016. p. 81–93.

PREDIGER, K. D. *et al.* A prospective study on *Aeromonas* in outpatients with diarrhea in the central region of Rio Grande do Sul State. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 43, n. 3, p. 966–968, jul. 2012.

PRESLEY, S. M. *et al.* Assessment of pathogens and toxicants in New Orleans, LA following Hurricane Katrina. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 2, p. 468–474, 15 jan. 2006.

PUTHUCHEARY, S. D.; PUAH, S. M.; CHUA, K. H. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. **PloS One**, v. 7, n. 2, p. e30205, 2012.

QUAINOO, S. *et al.* Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 1015–1063, out. 2017.

RABAAN, A. A. *et al.* Motility and the Polar Flagellum Are Required for *Aeromonas caviae* Adherence to HEp-2 Cells. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4257–4267, 7 jan. 2001.

RASMUSSEN-IVEY, C. R. *et al.* Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1337, 2016.

REARDON-ROBINSON, M. E. *et al.* Pilus hijacking by a bacterial coaggregation factor critical for oral biofilm development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 10, p. 3835–3840, 11 mar. 2014.

REITH, M. E. *et al.* The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. **BMC Genomics**, v. 9, p. 427, 18 set. 2008.

RICHTER, M. *et al.* JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 32, n. 6, p. 929–931, 15 2016.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 45, p. 19126–19131, 10 nov. 2009.

ROGER, F. *et al.* Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 62, 30 abr. 2012.

RUBIN, F. *et al.* Drainage of subperiosteal orbital abscesses complicating pediatric ethmoiditis: comparison between external and transnasal approaches. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 5, p. 796–802, maio 2013.

RUNCHAROEN, C. *et al.* Whole genome sequencing reveals high-resolution epidemiological links between clinical and environmental *Klebsiella pneumoniae*. **Genome Medicine**, v. 9, n. 1, p. 6, 24 2017.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, jul. 1987.

SCARIA, J. *et al.* Comparative genomic and phenomic analysis of *Clostridium difficile* and *Clostridium sordellii*, two related pathogens with differing host tissue preference. **BMC Genomics**, v. 16, p. 448, 10 jun. 2015.

SCOARIS, D. DE O. *et al.* Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas spp.* isolated from drinking water. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 93, n. 1–2, p. 111–122, fev. 2008.

SEGATORE, B. et al. High specificity of cphA-encoded metallo-beta-lactamase from *Aeromonas hydrophila* AE036 for carbapenems and its contribution to beta-lactam resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 6, p. 1324–1328, jun. 1993.

SENDEROVICH, Y et al. A molecular study on the prevalence and virulence potential of *Aeromonas spp.* recovered from patients suffering from diarrhea in Israel. **PloS One**, v. 7, n. 2, p. e30070, 2012.

SESHADRI, R. et al. Genome Sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966: Jack of All Trades. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 23, p. 8272–8282, dez. 2006.

SHA, J. et al. Evaluation of the roles played by Hcp and VgrG type 6 secretion system effectors in *Aeromonas hydrophila* SSU pathogenesis. **Microbiology (Reading, England)**, v. 159, n. Pt 6, p. 1120–1135, jun. 2013.

SHA, J. et al. Further characterization of a type III secretion system (T3SS) and of a new effector protein from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*--part I. **Microbial Pathogenesis**, v. 43, n. 4, p. 127–146, out. 2007.

SHA, J. et al. Differential expression of the enolase gene under in vivo versus in vitro growth conditions of *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**, v. 34, n. 4, p. 195–204, abr. 2003.

SHA, J. et al. The Type III Secretion System and Cytotoxic Enterotoxin Alter the Virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6446–6457, 10 jan. 2005.

SHA, J.; *et al.* Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 4, p. 1924–1935, abr. 2002.

SHA, J.; LU, M.; CHOPRA, A. K. Regulation of the cytotoxic enterotoxin gene in *Aeromonas hydrophila*: characterization of an iron uptake regulator. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 10, p. 6370–6381, out. 2001.

SHANKAR, C. *et al.* *et al.* Molecular characterisation for clonality and transmission dynamics of an outbreak of *Klebsiella pneumoniae* amongst neonates in a tertiary care centre in South India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 54–60, mar. 2018.

SHU, A.-C. *et al.* Evidence of DNA transfer through F-pilus channels during *Escherichia coli* conjugation. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 24, n. 13, p. 6796–6802, 1 jun. 2008.

SIERRA, J. C. *et al.* Biological characterization of a new type III secretion system effector from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*-part II. **Microbial Pathogenesis**, v. 43, n. 4, p. 147–160, out. 2007.

SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1079, p. 105–116, 2014.

SILVER, A. C. *et al.* Identification of *Aeromonas veronii* Genes Required for Colonization of the Medicinal Leech, *Hirudo verbana*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 19, p. 6763–6772, out. 2007.

SISTI, M.; ALBANO, A.; BRANDI, G. Bactericidal effect of chlorine on motile *Aeromonas spp.* in drinking water supplies and influence of temperature on disinfection efficacy. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 347–351, maio 1998.

SOARES, S. C. *et al.* GIPSy: Genomic island prediction software. **Journal of Biotechnology**, v. 232, p. 2–11, 20 ago. 2016.

SOLTAN DALLAL, M. M. *et al.* Prevalence, virulence and antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas spp.* isolated from children with diarrhea. **Germs**, v. 6, n. 3, p. 91–96, 1 set. 2016.

SPADARO, S. *et al.* *Aeromonas sobria* necrotizing fasciitis and sepsis in an immunocompromised patient: a case report and review of the literature. **Journal of Medical Case Reports**, v. 8, p. 315, 22 set. 2014.

SPATARO, N. *et al.* Draft Genome Sequence of *Aeromonas molluscorum* Strain 848TT, Isolated from Bivalve Molluscs. **Genome Announcements**, v. 1, n. 3, 20 jun. 2013.

STEEL, M. A.; FU, Y. X. Classifying and Counting Linear Phylogenetic Invariants for the Jukes–Cantor Model. **Journal of Computational Biology**, v. 2, n. 1, p. 39–47, 1 jan. 1995.

SUAREZ, G. *et al.* A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 1, p. 155–168, jan. 2010.

SUAREZ, G. *et al.* Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**, v. 44, n. 4, p. 344–361, abr. 2008.

SUI, S. J. H. *et al.* The Association of Virulence Factors with Genomic Islands. **PLOS ONE**, v. 4, n. 12, p. e8094, 1 dez. 2009.

SZEWZYK, U. *et al.* Microbiological safety of drinking water. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 81–127, 2000a.

TABEL, S. M. B. *et al.* An *Aeromonas caviae* Genomic Island Is Required for both O-Antigen Lipopolysaccharide Biosynthesis and Flagellin Glycosylation. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 8, p. 2851–2863, 15 abr. 2009.

TALAGRAND-REBOUL, E. *et al.* Delineation of Taxonomic Species within Complex of Species: *Aeromonas media* and Related Species as a Test Case. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

TANG, H.-J. *et al.* Clinical Manifestations of Bacteremia Caused by *Aeromonas* Species in Southern Taiwan. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 10 mar. 2014.

TEKEDAR, H. C. *et al.* Complete Genome Sequence of a Channel Catfish Epidemic Isolate, *Aeromonas hydrophila* Strain ML09-119. **Genome Announcements**, v. 1, n. 5, 19 set. 2013.

THOMAS, L. V. *et al.* Extended serogrouping scheme for motile, mesophilic *Aeromonas* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 980–984, maio 1990.

THOMPSON, C. C. *et al.* Microbial genomic taxonomy. **BMC genomics**, v. 14, p. 913, 23 dez. 2013.

TORTOLI, E. *et al.* Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus subsp. abscessus* and *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus subsp. massiliense* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4471–4479, 2016.

TROISFONTAINES, P.; CORNELIS, G. R. Type III secretion: more systems than you think. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 20, p. 326–339, out. 2005.

TSAI, M.-S. *et al.* Clinical features and risk factors for mortality in *Aeromonas* bacteremic adults with hematologic malignancies. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, v. 39, n. 2, p. 150–154, abr. 2006.

TSENG, T.-T.; *et al.* Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. **BMC microbiology**, v. 9 Suppl 1, p. S2, 19 fev. 2009.

TSHETEN, T. *et al.* An Outbreak of *Aeromonas hydrophila* Food Poisoning in Deptsang Village, Samdrup Jongkhar, Bhutan, 2016. **Journal of Research in Health Sciences**, v. 16, n. 4, p. 224–227, 2016.

TUMBARELLO, M. *et al.* Factors associated with mortality in bacteremic patients with hematologic malignancies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 3, p. 320–326, jul. 2009.

UHRYNOWSKI, W. *et al.* Analysis of the Genome and Mobilome of a Dissimilatory Arsenate Reducing *Aeromonas* sp. O23A Reveals Multiple Mechanisms for Heavy Metal Resistance and Metabolism. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 29 maio 2017.

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. J. Multilocus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 479–487, 1 out. 2003.

VALDES, N. *et al.* et al. Draft genome sequence of the Chilean isolate *Aeromonas salmonicida* strain CBA100. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 5, 1 mar. 2015.

VAN ZWETSELAAR, M. *et al.* *Aeromonas caviae* mimicking *Vibrio cholerae* infectious enteropathy in a cholera-endemic region with possible public health consequences: two case reports. **Journal of Medical Case Reports**, v. 12, n. 1, p. 71, 17 mar. 2018.

VANDERLINDE, E. M. *et al.* Assembly of the Type Two Secretion System in *Aeromonas hydrophila* Involves Direct Interaction between the Periplasmic Domains of the Assembly Factor ExeB and the Secretin ExeD. **PLOS ONE**, v. 9, n. 7, p. e102038, 15 jul. 2014.

VASAIKAR, S. *et al.* *Aeromonas* species isolated from cases of acute gastroenteritis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 107–109, jun. 2002.

VERRIERE, B. *et al.* Medicinal leech therapy and *Aeromonas spp.* infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1001–1006, jun. 2016.

VILLARI, P. *et al.* et al. Molecular Typing of *Aeromonas* Isolates in Natural Mineral Waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 697–701, 1 jan. 2003.

VILLARREAL-CHIU, J. F.; QUINN, J. P.; MCGRATH, J. W. The Genes and Enzymes of Phosphonate Metabolism by Bacteria, and Their Distribution in the Marine Environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 26 jan. 2012.

VINCENT, A. T. et al. Increasing genomic diversity and evidence of constrained lifestyle evolution due to insertion sequences in *Aeromonas salmonicida*. **BMC genomics**, v. 17, p. 44, 12 jan. 2016.

VON GRAEVENITZ, A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. **Infection**, v. 35, n. 2, p. 59–64, abr. 2007.

WANG, H.-C. et al. Genome Sequence of *Aeromonas taiwanensis* LMG 24683T, a Clinical Wound Isolate from Taiwan. **Genome Announcements**, v. 2, n. 3, 12 jun. 2014.

WANG, Y.; GU, J. Influence of temperature, salinity and pH on the growth of environmental *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from Mai Po and the Inner Deep Bay Nature Reserve Ramsar Site of Hong Kong. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 83–93, 1 fev. 2005.

WILCOX, M. H. et al. *Aeromonas* spp as a potential cause of diarrhoea in children. **Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 11, p. 959–963, nov. 1992.

WIMALASENA, S. H. M. P. et al. Prevalence and characterisation of quinolone resistance genes in *Aeromonas spp.* isolated from pet turtles in South Korea. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 11, p. 34–38, 1 dez. 2017.

WINGENDER, J.; FLEMMING, H.-C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 6, p. 417–423, nov. 2011.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, nov. 1977.

WU, C.-J. et al. Bacteremia Due to Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Aeromonas spp.* at a Medical Center in Southern Taiwan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5813–5818, 12 jan. 2011.

WU, C.-J. et al. Distribution and phenotypic and genotypic detection of a metallo- β -lactamase, CphA, among bacteraemic *Aeromonas* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. Pt 5, p. 712–719, maio 2012.

YAMANAKA, H. et al. MacAB Is Involved in the Secretion of *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin II. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 23, p. 7693–7698, dez. 2008.

YU, H. B. et al. A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1248–1256, mar. 2004.

ZHANG, Q. et al. A foodborne outbreak of *Aeromonas hydrophila* in a college, Xingyi City, Guizhou, China, 2012. **Western Pacific surveillance and response journal: WPSAR**, v. 3, n. 4, p. 39–43, out. 2012.

ZHANG, S.-X. *et al.* Impact of co-infections with enteric pathogens on children suffering from acute diarrhea in southwest China. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, n. 1, p. 64, 27 jun. 2016.

ZHANG, X.-X. *et al.* Antibiotic resistance genes in water environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 397–414, mar. 2009.

9. ANEXOS

ANEXO 1: Genes de resistência a antibióticos encontrados em *Aeromonas sp* V15, assim como os seus respectivos produtos e *locus tag*, identidade e número de aminoácidos.

ANEXO 2: As ilhas genômicas que possuem classificação, encontradas no genoma de *Aeromonas sp* V15, com as ORFs e os seus respectivos nomes da proteína.

ANEXO 3: Fatores de virulência encontrados no genoma de *Aeromonas sp* V15 e os suas respectivas classificações, nome da proteína, nome do gene, locustag, número de aminoácidos e identidade.

ANEXO 4 : Publicação na revista Acta Scientae & Technicae - As superbactérias resistentes a antibióticos estão chegando?

ANEXO 1: Genes de resistência a antibióticos encontrados em *Aeromonas sp* V15, assim como os seus respectivos produtos e *locus tag*, identidade (Ident.) e número de aminoácidos (Núm.de AA.), respectivamente.

Genes	Produtos	Locus Tag	Ident.	Núm. de AA.
<i>cphA</i>	Beta-lactamase subclasse B2 (cphA) parcial	648.104.peg.1629	100.00	69
<i>bla_{mox6}</i>	Beta-lactamase de classe C (AmpC)	648.104.peg.1580	97.56	1149
<i>bla_{OXA504}</i>	Beta-lactamase classe D	648.104.peg.2211	98.62	795
<i>macB</i>	Permease/ATP exportadora de macrolídeo MacB	648.104.peg.765	74.15	646
<i>macB</i>	Permease/ATP exportadora de macrolídeo MacB	648.104.peg.508	86.01	672
<i>macA</i>	Proteína de efluxo específica de macrolídeo MacA	648.104.peg.764	43.15	359
<i>macA</i>	Proteína de efluxo específica de macrolídeo MacA	648.104.peg.509	87.53	377
<i>opmH</i>	Canal de membrana exterior TolC	648.104.peg.3061	99.77	441
<i>qnrA</i>	Proteína Pentapeptídeo repetitivo família QnrA	648.104.peg.986	87.34	79
<i>parC</i>	DNA topoisomerase IV subunidade A (mutações)	648.104.peg.3072	100	204

ANEXO 2: As ilhas genômicas que possuem classificação, encontradas no genoma de *Aeromonas sp* V15, com as ORFs e os seus respectivos nomes da proteína, respectivamente.

Ilhas	ORF	Nome da Proteína
Ilha genômica 4	4.1	Proteína hipotética
	4.2	Proteína hipotética
	4.3	Proteína hipotética
	4.4	YcgN family cysteine cluster protein
	4.5	glycine/D-amino acid oxidase
	4.6	ABC transporter, permease protein
	4.7	Ferric cations import ATP-binding protein FbpC
	4.8	Phosphonate ABC transporter substrate-binding
	4.9	2-aminoethylphosphonate transport, repressor
	4.10	2-aminoethylphosphonate--pyruvate transaminase
	4.11	2-aminoethylphosphonate--pyruvate transaminase
	4.12	Phosphonoacetaldehyde hydrolase
Ilha genômica 10	10.1	Proteína hipotética
	10.2	nucleoside-diphosphate sugar epimerase
	10.3	Lipid Transferase
	10.4	UDP-glucose 4-epimerase
	10.5	glycosyl transferase
	10.6	rhamnosyltransferase
	10.7	Proteína hipotética
	10.8	Proteína hipotética
	10.9	Proteína hipotética
	10.10	Proteína hipotética
	10.11	glycosyltransferase family 2 protein
	10.12	putative flippase
	10.13	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase
	10.14	glucose-1-phosphate thymidyltransferase
	10.15	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase
	10.16	O-antigen chain length regulator
Ilha Genômica 11	11.1	transposase
	11.2	transposase
	11.3	Proteína hipotética
	11.4	Proteína hipotética
	11.5	YgiQ family radical SAM protein
	11.6	multidrug transporter AcrB
	11.7	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase
Ilha Genômica 5	1	Auxin Efflux Carrier
	2	Prophage MuSo1, transcriptional regulator, Cro/Ci family
	3	integrase

	4	Prophage MuSo1, DNA transposition protein, putative
	5	Proteína hipotética
	6	transcriptional regulator
	7	Proteína hipotética
	8	Gp05
	9	Proteína hipotética
	10	Proteína hipotética
	11	Proteína hipotética
	12	regulatory protein GemA
	13	transcriptional regulator
	14	Proteína hipotética
	15	Proteína hipotética
	16	secretion activator protein
	17	Proteína hipotética
	18	Proteína hipotética
	19	molecular chaperone DnaK
	20	Proteína hipotética
	21	putative prophage protein
	22	Protein gp27
	23	Mu-like prophage FluMu protein gp28
	24	Mu-like phage gp291
	25	F protein
	26	Proteína hipotética
	27	phage tail protein
	28	F protein
	29	Putative phage major head subunit
	30	Proteína hipotética
	31	Proteína hipotética
	32	Proteína hipotética
	33	Proteína hipotética
	34	Proteína hipotética
	35	Mu-like prophage FluMu I protein
	36	Proteína hipotética
	37	virion morphogenesis protein
	38	Proteína hipotética
	39	curculin (mannose-binding) lectin protein
	40	Proteína hipotética
	41	Proteína hipotética
	42	putative bacteriophage-related protein
	43	Proteína hipotética
	44	Proteína hipotética
	45	Proteína hipotética
	46	auxin Efflux Carrier

ANEXO 3: Fatores de virulência encontrados no genoma de *Aeromonas sp* V15 e os suas respectivas classificações, nome da proteína, nome do gene, *locustag*, número de aminoácidos (Núm. de AA) e identidade (Ident.), respectivamente

	Proteína	Gene	LocusTag	Núm. de AA	Ident.
Toxinas	Hemolisina HlyA	<i>hlyA</i>	648.104.peg.1292	439	99.54
	Hemolisina III	—	648.104.peg.4179	210	99.0
	Enterotoxina citotônica calor lábil	<i>alt</i>	648.104.peg.2038	805	95.2
Enzimas	Enolase	<i>eno</i>	648.104.peg.83	433	98.00
	Exoribonuclease R	<i>vacB</i>	648.104.peg.3237	797	97.11
	Sideróforo	<i>tolQ</i>	648.104.peg.1850	457	99.0
		<i>exbB</i>	648.104.peg.1851	175	99.0
		<i>exbD</i>	648.104.peg.1852	135	99.1
		<i>tonB</i>	648.104.peg.1853	211	99.2
		<i>tpr</i>	648.104.peg.1854	411	99.3
Motilidade e Adesão	Flagelo Polar	<i>flgN</i>	648.104.peg.1183	138	77.37
		<i>flgM</i>	648.104.peg.1184	320	88.79
		<i>flgA</i>	648.104.peg.1185	209	84.62
		<i>cheV</i>	648.104.peg.1186	303	97.69
		<i>cheR</i>	648.104.peg.1187	274	96.35
		<i>flgB</i>	648.104.peg.1188	133	91.67
		<i>flgC</i>	648.104.peg.1189	139	94.96
		<i>flgD</i>	648.104.peg.1190	245	66.67
		<i>flgE</i>	648.104.peg.1191	448	76.89
		<i>flgF</i>	648.104.peg.1192	248	95.16
		<i>flgG</i>	648.104.peg.1193	262	94.27
		<i>flgH</i>	648.104.peg.1194	224	88.79
		<i>flgI</i>	648.104.peg.1195	365	92.88

Motilidade e Adesão		<i>flgJ</i>	648.104.peg.1196	366	79.94
		<i>flgK</i>	648.104.peg.1197	665	78.83
		<i>flgL</i>	648.104.peg.1198	402	80.60
	Flagelo Lateral	<i>motB</i>	648.104.peg.322	315	99.68
		<i>motA</i>	648.104.peg.323	285	99.65
		<i>lafU</i>	648.104.peg.324	236	98.31
		<i>lafT</i>	648.104.peg.325	248	99.31
		<i>lafS</i>	648.104.peg.326	349	97.71
		<i>lafF</i>	648.104.peg.327	245	98.21
		<i>lafE</i>	648.104.peg.328	256	100.00
		<i>lafX</i>	648.104.peg.329	427	99.77
		<i>lafC</i>	648.104.peg.330	286	77.93
		<i>lafB</i>	648.104.peg.331	289	80.97
		<i>lafA</i>	648.104.peg.332	387	98.88
		<i>maf-5</i>	648.104.peg.333	333	99.40
		<i>flgK</i>	648.104.peg.335	439	99.77
		<i>flgJ</i>	648.104.peg.336	468	100.00
		<i>flgI</i>	648.104.peg.337	368	100.00
		<i>flgH</i>	648.104.peg.338	223	100.00
		<i>flgG</i>	648.104.peg.339	261	99.62
		<i>flgF</i>	648.104.peg.340	244	99.59
		<i>flgE</i>	648.104.peg.341	397	99.75
		<i>flgD</i>	648.104.peg.342	227	99.56
		<i>flgC</i>	648.104.peg.343	325	100.00
		<i>flgB</i>	648.104.peg.344	354	100.00
		<i>flgA</i>	648.104.peg.345	284	100.00
		<i>flgM</i>	648.104.peg.346	258	98.89
		<i>flgN</i>	648.104.peg.347	147	100.00
		<i>fliJ</i>	648.104.peg.348	145	99.28

Motilidade e Adesão		<i>fliI</i>	648.104.peg.349	443	99.77
		<i>fliH</i>	648.104.peg.350	230	100.00
		<i>fliG</i>	648.104.peg.351	342	100.00
		<i>fliF</i>	648.104.peg.352	584	99.83
		<i>fliE</i>	648.104.peg.353	345	52.63
		<i>lafK</i>	648.104.peg.354	458	99.78
		<i>flhA</i>	648.104.peg.355	691	48.31
		<i>flhB</i>	648.104.peg.356	378	99.74
		<i>fliR</i>	648.104.peg.357	260	99.62
		<i>fliQ</i>	648.104.peg.358	241	100.00
		<i>fliP</i>	648.104.peg.359	244	100.00
		<i>fliN</i>	648.104.peg.360	245	100.00
	Pili tipo IV (MSH)	<i>mshP</i>	648.104.peg.1393	149	86.58
		<i>mshO</i>	648.104.peg.1394	253	81.82
		<i>mshD</i>	648.104.peg.1395	190	97.89
		<i>mshA</i>	648.104.peg.1398	205	100.00
		<i>mshF</i>	648.104.peg.1399	152	98.68
		<i>mshG</i>	648.104.peg.1400	406	100.00
		<i>mshE</i>	648.104.peg.1401	579	44.94
		<i>mshM</i>	648.104.peg.1402	378	98.15
		<i>mshN</i>	648.104.peg.1403	296	99.66
		<i>mshL</i>	648.104.peg.1405	558	99.28
		<i>mshK</i>	648.104.peg.1406	100	98.00
		<i>mshJ</i>	648.104.peg.1407	215	99.07
		<i>mshI</i>	648.104.peg.1408	197	98.98
		<i>mshI</i>	648.104.peg.1409	287	98.95
		<i>mshA</i>	648.104.peg.1410	302	98.01
		<i>mshH</i>	648.104.peg.1411	639	99.84
	Pili tipo IV (tap)	<i>tapA</i>	648.104.peg.3225	135	100.00

		<i>tapB</i>	648.104.peg.3226	187	98.40
		<i>tapC</i>	648.104.peg.3227	333	99.40
Sistema de Secreção	T2SS	<i>exeA</i>	648.104.peg.180	247	99.60
		<i>exeB</i>	648.104.peg.181	163	98.77
		<i>exeC</i>	648.104.peg.182	394	98.98
		<i>exeF</i>	648.104.peg.185	114	99.12
		<i>exeG</i>	648.104.peg.186	187	98.93
		<i>exeH</i>	648.104.peg.187	143	100.00
		<i>exeI</i>	648.104.peg.188	406	99.75
		<i>exeJ</i>	648.104.peg.189	501	100.00
		<i>exeM</i>	648.104.peg.191	282	98.94
		<i>exeN</i>	648.104.peg.192	132	98.48
		<i>tapD</i>	648.104.peg.297	290	82.00
	T6SS	<i>hcp</i>	648.104.peg.2530	172	99.42
		<i>vgrG</i>	648.104.peg.2531	681	96.77
		<i>rhs</i>	648.104.peg.2533	1440	98.12
		<i>sel1</i>	648.104.peg.2534	174	98.00
		<i>impB</i>	648.104.peg.2536	649	100.00
		<i>impC</i>	648.104.peg.2537	242	96.50
		<i>impG</i>	648.104.peg.2539	588	99.49
		<i>impH</i>	648.104.peg.2540	321	99.69
		<i>vasD</i>	648.104.peg.2541	416	99.76
		<i>impJ</i>	648.104.peg.2543	444	98.19
		<i>impK</i>	648.104.peg.2544	236	99.77
		<i>vasG</i>	648.104.peg.2545	417	100.00
		<i>δ54</i>	648.104.peg.2546	423	37.17
		<i>vasJ</i>	648.104.peg.2548	416	41.10
		<i>impL</i>	648.104.peg.2549	1161	96.02
		<i>vasL</i>	648.104.peg.2550	476	99.05

		<i>vgrG</i>	648.104.peg.2551	236	99.58
--	--	-------------	------------------	-----	-------

ANEXO 4 : Publicação na revista Acta Scientae & Technicae - As superbactérias
resistentes a antibióticos estão chegando?

AS SUPERBACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS ESTÃO CHEGANDO?

**Victor Hugo Moreira e
Alexander Machado Cardoso**

No final do ano de 2016, o bilionário fundador da Microsoft Bill Gates afirmou em uma entrevista para uma rádio inglesa que o seu maior temor era em relação às superbactérias resistentes a antibióticos e não aos vírus de computador, segundo ele: “É alto o risco de uma pandemia provocada pela resistência a antibióticos na próxima década”, coincidentemente, duas semanas após esta afirmação, o Centro Americano de Controle e Prevenção de Doenças (CDC: <https://www.cdc.gov/>) relatou o caso com morte de uma paciente devido a uma bactéria resistente a todos os antibióticos existentes, provocando um grande temor na comunidade científica internacional. Segundo relato disponível no site do CDC, a vítima tinha 70 anos e foi infectada por uma cepa mutante da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, a paciente teria sido infectada na Índia, onde foi tratada por uma simples fratura na perna. Você pode pensar que a resistência a antibióticos é um fenômeno recente e ligado apenas às bactérias patogênicas, ao incorreto uso dos medicamentos para tratar infecções e ao ambiente hospitalar. No entanto, já

em 2009, Wright e colaboradores, ao analisaram 480 cepas de bactérias originárias do solo de diversos locais urbanos, rurais e florestais, frente a 21 diferentes antibióticos, incluindo tanto antibióticos sintetizados por micro-organismos, como vancomicinas, antibióticos semissintéticos (derivados de antibióticos naturais), como cefalexinas e os antibióticos sintéticos (sintetizados quimicamente) observaram que um número significativo das cepas testadas foram resistentes a pelo menos 8 antibióticos, ou até mesmo, aos 21 antibióticos utilizados sendo consideradas bactérias multirresistentes.

Dois anos depois, em 2011, os mesmos pesquisadores realizaram uma análise metagenômica (análise do genoma coletivo dos micro-organismos de um determinado ambiente por técnicas independentes de cultivo para revelar toda a microbiota presente em um determinado ambiente) de sedimento datado de 30.000 anos constituído por terra, gelo e rochas permanentemente congelados encontrado na região do Ártico, que revelou uma variada coleção de genes que codificam resistência a antibióticos como tetraciclina, beta-lactâmicos e glicopeptídeos. O mesmo estudo observou uma similaridade entre o gene que confere resistência à vancomicina ancestral ao gene de resistência encontrado em estirpes atuais, sugerindo que a resistência a antibióticos é um fenômeno antigo, natural e que não está relacionado somente a bactérias patogênicas, mas a outras bactérias encontradas no ambiente, a maioria ainda desconhecida, sendo

o ambiente deste modo considerado um reservatório de gene que conferem resistência a antibióticos.

Um dos maiores reservatórios para a aquisição de genes de resistência são as águas superficiais. Em 2010, Luo e colaboradores, observaram a presença de genes de resistência para sulfonamidas em amostras de água e sedimentos do rio Haihe, na China, sugerindo que a poluição é um fator que deve ser levado em consideração uma vez que os resíduos podem provocar uma pressão para que haja a seleção de cepas resistentes. Xiong e colaboradores, em 2014, também analisaram a presença de genes de resistência para tetraciclina, sulfonamida, equinolona por métodos independentes de cultura e simultaneamente analisaram a presença dos mesmos antibióticos na água. Os resultados mostraram que foram detectados traços de antibióticos no sedimento do rio, porém, as águas possuíam um nível

um nível abaixo do limite detecção, em relação aos genes analisados, foram observados genes de resistência para todos os antibióticos analisados. Aqui no Brasil, trabalhos pioneiros de Coutinho e colaboradores revelaram evidências que a seleção da resistência a determinados antibióticos em ambientes

É alto o risco de uma pandemia provocada pela resistência a antibióticos na próxima década, afirma o bilionário fundador da Microsoft Bill Gates.

aquáticos pode ser influenciada pela poluição.

Por incrível que pareça, a água potável também pode possuir genes de resistência, como também transmitir esta resistência às bactérias patogênicas conhecidas. Em 2012, Falcone-Dias e colaboradores, analisaram nove lotes de água potáveis engarrafadas vendidas

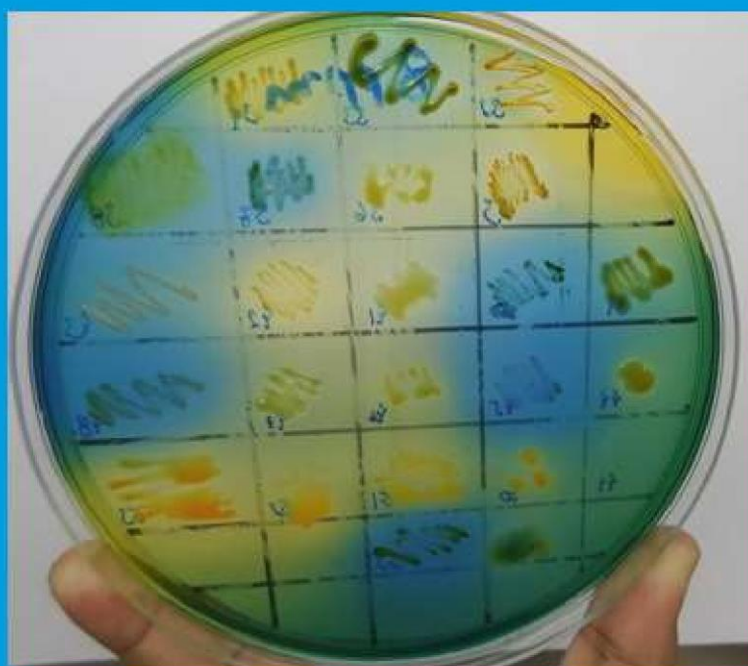


Figura 1: Placa de Petri contendo diferentes cepas de bactérias, a maioria resistente a antibióticos.

comercialmente em Portugal e na França. Foram isoladas ao todo 238 cepas as quais foram avaliadas sua resistência a 22 antibióticos. Todas as cepas possuíam resistência a todos os antibióticos! A maioria possuindo resistência a pelo menos 3 antibióticos ao mesmo tempo, sendo muitos gêneros relacionados com casos de infecção hospitalar. Além disso, os genes de resistência podem passar da água bruta para a água potável. Em 2016, Adesoji e colaboradores da Nigéria isolaram bactérias de amostras de água bruta, tratada e distribuída para o consumidor utilizando a PCR (técnica de amplificação de DNA), sendo encontrados genes que conferem resistência a antibióticos tais como sulfonamida, trimetoprim e aminoglicosídeos. Foi observada uma diminuição do número de isolados resistentes da água bruta para a tratada e um aumento quando chega ao consumidor, revelando a importância de medidas para evitar a possível contaminação durante a distribuição.

Outro ambiente aquático que está relacionado com a resistência aos antibióticos são as águas residuárias, principalmente as de origem hospitalar por carrear não apenas resíduos médicos, mas também micro-organismos com alta patogenicidade. Em 2004, Volkmann e colaboradores, do Instituto Técnico de Química da Alemanha, analisaram amostras de uma estação de tratamento de esgoto em três momentos: antes de passarem pelo tratamento, durante o tratamento e pós-tratamento, para a quantificação de genes de resistência sendo

encontradas resistências para vancomicina e beta-lactâmicos, sendo observada uma relação significativa entre a presença de antibióticos e os genes de resistência.

Em conclusão, a resistência de micro-organismos a antibióticos é considerada uma emergência pela Organização Mundial de Saúde (OMS, <http://www.who.int>), porém este tema não pode ser visto como um processo exclusivo do ambiente hospitalar, mas um fenômeno também encontrado na natureza. O meio ambiente é considerado um reservatório de genes de resistência para bactérias patogênicas. Segundo a OMS mais de um bilhão de pessoas não possuem acesso à água potável adequada, a maioria em países de baixo grau de desenvolvimento, em

Cientistas analisaram lotes de água potáveis engarrafadas vendidas comercialmente em Portugal e na França, encontrando 238 cepas resistentes a 22 antibióticos.

em decorrência disto, ainda de acordo com a mesma organização a mortalidade das doenças veiculadas pela água excede 5 milhões de pessoas por ano. Destes, mais de 50% são infecções intestinais microbianas, afetando um grande número de pessoas, sendo mais suscetíveis crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas. Há uma grande lacuna em relação sobre possível impacto que podem ter no ambiente e para o homem de novos genes e micro-organismos resistentes a antibióticos, há poucos estudos sobre detecção, monitoramento e medidas para minimização deste problema. Com

aquecimento global, derretimento de geleiras, destruição de ecossistemas, “novas” cepas serão reveladas. Estaremos preparados?

Referências

WRIGHT GD, et al. 2006. Sampling the antibiotic resistome. Science 311:374-377.

WRIGHT GD, et al. 2011. Antibiotic resistance is ancient. Nature 477: 457-461.

LUO Y, et al. 2011. Occurrence and transport of tetracycline, sulfonamide, quinolone, and macrolide antibiotics in the Haihe River Basin, China. Environmental Science & Technology 45: 1827-1833.

XIONG W, et al. 2014. Antibiotic resistance genes occurrence and bacterial community composition in the Liuxi River. Frontiers in Environmental Science 2: 1-6.

COUTINHO FH, et al. 2014. Antibiotic Resistance is Widespread in Urban Aquatic Environments of Rio de Janeiro, Brazil. Microbial Ecology 68: 441-452.

FALCONE-DIAS MF, et al. 2012. Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria. Water Research 46: 3612-3622.

ADESOJI AT, et al. 2016. Characterization of integrons and sulfonamide resistance genes among bacteria from drinking water distribution systems in Southwestern Nigeria.

VOLKMANN H, et al. 2004. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). Journal of Microbiological Methods 56: 277-286.

Victor Hugo Moreira é discente do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (UEZO/UNIGRANRIO/INMETRO) e Alexander Machado Cardoso é Professor Adjunto e pró-reitor de Pesquisa da Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, sendo também pesquisador do Laboratório de Biotecnologia Ambiental (UEZO).

MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO