

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

BEATRIZ SOUZA TOSCANO DE MELO

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E ANÁLISE GENÔMICA DE ISOLADOS DE
Aeromonas spp.

RECIFE

2018

BEATRIZ SOUZA TOSCANO DE MELO

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E ANÁLISE GENÔMICA DE ISOLADOS DE
Aeromonas spp.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Nilma Cintra Leal

Coorientadora: Dra. Carina Lucena Mendes Marques

RECIFE

2018

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- M528c Melo, Beatriz Souza Toscano de
 Classificação taxonômica e análise genômica de
 isolados de *Aeromonas* spp / Beatriz Souza Toscano de
 Melo. Recife: [s.n.], 2018.
 79 p. : il., tab., graf.
- Dissertação (Mestrado em Biociências e
 Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães,
 Fundação Oswaldo Cruz, 2018.
 Orientadora: Nilma Cintra Leal; coorientador:
 Carina Lucena Mendes Marques.
1. *Aeromonas* - classificação. 2. *Aeromonas* -
 isolamento & purificação. 3. Filogenia. 4. Genoma. I.
 Leal, Nilma Cintra. II. Marques, Carina Lucena
 Mendes. III. Título.

CDU 616.955.122

BEATRIZ SOUZA TOSCANO DE MELO

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E ANÁLISE GENÔMICA DE ISOLADOS DE
Aeromonas spp.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 23/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Dra. Nilma Cintra Leal
Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE)

Dr. Gabriel da Luz Wallau
Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE)

Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Dra. Nilma Cintra Leal e Dra. Carina Lucena Mendes Marques por toda confiança, todo suporte e todo carinho. Vocês sempre me ouviram, me aconselharam e sempre deixaram as portas abertas para mim. Minha eterna gratidão a vocês por todo conhecimento compartilhado e por me ajudarem a ser uma profissional melhor a cada dia.

Ao Dr. Danilo Elias Xavier por toda atenção, incentivo, ideias e animação. E a todo o grupo RestBact: Igor, Gabriela, Carlos e Lílian pelo suporte diário e descontração no laboratório.

Ao Dr. Antônio Mauro Rezende, Túlio Campos e à toda equipe de Bioinformática do IAM, obrigada pela paciência e todos os conhecimentos compartilhados, esse trabalho não seria possível sem o apoio de vocês.

Aos meus pais, Otávio e Catarina e a toda minha família pelo amor, incentivo, por sempre torcerem por mim e me apoiarem em todas as minhas decisões.

Aos grandes amigos que a vida me deu, João Pitta e Crhisllane, obrigada por tudo. Os cafés, risadas e toda atenção de vocês foram fundamentais para mim. Vocês são verdadeiros presentes da vida.

Às amigas de uma vida Jéssica, Amanda e Raíza e agora aos nossos mascotes Michelzinho e Olívia, obrigada por há tantos anos estarem ao meu lado, sempre me ouvirem e estarem sempre de braços abertos para mim. À Ana Luísa, Kerolayne e Raysa por sempre me apoiarem e se orgulharem de mim. Aos amigos de turma do mestrado, que sempre foram os lindos e fizeram as disciplinas e essa jornada serem mais fáceis. Aos amigos do laboratório de Microbiologia do IAM por todo suporte e por serem tão prestativos. E, agradeço a todos os amigos que sempre entenderam a ausência, mas que sempre se fizeram presente de alguma forma, sempre trazendo sorrisos e deixando a vida mais leve. Contem sempre comigo.

A Thiago Cavalcante, por ter me incentivado a ser uma boa acadêmica, desde 2011, quando me deu meu primeiro livro de metodologia científica, e, sobretudo, por me incentivar diariamente a ser uma pessoa melhor. Você é um exemplo de foco e dedicação.

Aos técnicos do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) e à equipe do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT), por todo suporte que deram para a realização desse trabalho.

Aos membros da banca examinadora que gentilmente aceitaram o convite para contribuir neste trabalho.

Ao Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz-PE e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por todos os recursos e suporte científico.

MELO, Beatriz Souza Toscano de. **Classificação taxonômica e análise genômica de isolados de *Aeromonas* spp.** 2018. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018

RESUMO

A taxonomia do gênero *Aeromonas* é bastante complexa e tem sido submetida a várias revisões devido à descrição de novas espécies e à reclassificação de espécies previamente validadas. Há, atualmente, 36 espécies descritas para esse gênero. Em estudo prévio realizado por este grupo de pesquisas, foram obtidos 119 isolados de *Aeromonas* spp. durante em um surto de diarreia que ocorreu em 2004 no município de São Bento do Una, Pernambuco. Destes, dois isolados de *Aeromonas* spp. (Aer294 e Aer593) apresentaram posições filogenéticas que indicavam que esses isolados eram diferentes das espécies de *Aeromonas* já descritas. O presente trabalho teve como objetivo esclarecer a posição taxonômica destes dois isolados de *Aeromonas* que não agruparam com nenhuma das espécies descritas. Sequências de seis genes *housekeeping* desses isolados (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* e *dnaX*) foram obtidas, a partir do sequenciamento de genoma completo, para análise filogenética através da técnica *Multilocus Phylogenetic Analysis* (MLPA) com sequências parciais desses mesmos genes para as 36 espécies atualmente descritas para o gênero *Aeromonas*. O isolado Aer294 agrupou com a espécie *Aeromonas australiensis*, recentemente descrita, e o isolado Aer593 formou um ramo independente, sugerindo que seria uma nova espécie do gênero. A identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF dos isolados Aer294 e Aer593 foi *A. veronii* e *A. caviae*, respectivamente, em discordância com os resultados da filogenia. Para confirmação sobre suas posições taxonômicas os isolados foram submetidos a hibridização *in silico* e à comparação genômica por identidade média de nucleotídeos, que teve como resultado que o isolado Aer593 pertence à espécie *A. caviae*, enquanto o Aer294 pertence à espécie *A. australiensis*. Esses resultados foram confirmados pelo MLPA com CDS completa para os seis genes *housekeeping* e também pelo *core* genoma. Esse estudo mostrou que por embora o MLPA seja um bom método de classificação, ele pode levar a conclusões equivocadas sobre a posição de algumas cepas de *Aeromonas* e que a melhor forma de classificar novas espécies desse gênero é a partir da análise filogenética utilizando *core* genoma.

Palavras-chave: *Aeromonas*. Taxonomia. Genomas.

MELO, Beatriz Souza Toscano de. **Taxonomic classification and genomic analysis of *Aeromonas* spp. strains**. 2018. Dissertation (Master of Bioscience and Biotechnology for Health) – Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2018.

ABSTRACT

The taxonomy of the genus *Aeromonas* is quite complex and has undergone several revisions due to the description of new species and reclassification of previously validated species. There are currently 36 species described for this genus. In a previous study carried out by this research group, 119 isolates of *Aeromonas* spp. during an outbreak of diarrhea that occurred in 2004 in the municipality of São Bento do Una, Pernambuco. Of these, two isolates of *Aeromonas* spp. (Aer294 and Aer593) presented the phylogenetic lines that indicated that the isolates were different from the *Aeromonas* species already described. The present work had as objective to clarify a taxonomic position of the two *Aeromonas* isolates that did not group with the species of the genus. Sequences of six housekeeping genes of these strains (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* e *dnaX*) were obtained from complete genome sequencing for phylogenetic analysis using the Multilocus Phylogenetic Analysis (MLPA) technique with partial sequences of the genes also for 36 species available for the genus *Aeromonas*. The Aer294 isolate grouped with an *Aeromonas australiensis* specie and the Aer593 isolate formed an independent line, suggesting that it is a new species of the genus. Identification by MALDI-TOF mass spectrometry of Aer294 and Aer593 isolates was *A. veronii* and *A. caviae*, respectively, in disagreement with the results of the phylogeny. For confirmation of their taxonomic positions, the isolates were submitted to *in silico* hybridization and to the genomic comparison by Average Nucleotide Identity, which resulted that the Aer593 strain belongs to the species *A. caviae* and the Aer294 belongs to the species *A. australiensis*. These results were confirmed by the MLPA with complete CDS for the six housekeeping genes and by the core genome phylogenetic analysis. This study showed that although MLPA is a good method of species classification, it may lead to misleading conclusions about the position of some strains of *Aeromonas* and that the best way to classify new species of this genus is from phylogenetic analysis using the core genome.

Keywords: *Aeromonas*. Taxonomy. Genomes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Fontes ambientais de <i>Aeromonas spp.</i> com potencial de colonizar e infectar indivíduos. | 16 |
| Figura 2 – Microscopia eletrônica de transmissão de <i>Aeromonas caviae</i> cepa Sch3N..... | 17 |
| Figura 3 - Árvore filogenética (<i>neighbor-joining</i>) derivada de sequências concatenadas dos genes <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> , <i>recA</i> , <i>dnaJ</i> , <i>gyrA</i> e <i>dnaX</i> contendo as 36 espécies atualmente descritas para o gênero <i>Aeromonas</i> | 23 |
| Figura 4 – Árvore filogenética circular (<i>neighbor-joining</i>) derivada das sequências concatenadas dos genes 16S rRNA e <i>gyrB</i> mostrando relação entre 119 isolados de <i>Aeromonas</i> e 26 espécies deste gênero. | 27 |
| Figura 5 – Árvore filogenética (<i>neighbor-joining</i>) derivada de sequências parciais dos genes <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> , <i>recA</i> , <i>dnaJ</i> , <i>gyrA</i> e <i>dnaX</i> concatenadas. | 48 |
| Figura 6 – Árvore filogenética (máxima-verossimilhança) derivada de sequências parciais dos genes <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> , <i>recA</i> , <i>dnaJ</i> , <i>gyrA</i> e <i>dnaX</i> concatenadas. | 49 |
| Figura 7 - Árvore filogenética (<i>neighbor-joining</i>) derivada de sequências concatenadas de regiões codificantes completas dos genes <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> , <i>recA</i> , <i>dnaJ</i> , <i>gyrA</i> e <i>dnaX</i> | 55 |
| Figura 8 - Árvore filogenética a partir do core genoma. Relação do isolado Aer593 com cepas de <i>Aeromonas caviae</i> e outras sete espécies de <i>Aeromonas</i> intimamente relacionadas. | 56 |
| Figura 9 – Árvore filogenética (<i>neighbor-joining</i>) a partir da CDS completa (2432 pb) do gene <i>gyrB</i> | 58 |
| Figura 10 – Árvore filogenética (<i>neighbor-joining</i>) a partir da CDS completa (1815 pb) do gene <i>rpoD</i> | 60 |
| Figura 11 – Representação do genoma do isolado Aer294 predito pelo RAST <i>server</i> | 63 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 Espécies de Aeromonas atualmente descritas com suas fontes de isolamento e referências..... | 22 |
| Tabela 2 Identificação de isolados de Aeromonas spp. por MALDI-TOF MS..... | 43 |
| Tabela 3 Número de contigs resultantes por diferentes montagens genômicas. | 45 |
| Tabela 4 Tamanho dos genomas, valor de N50 e conteúdo GC dos isolados de Aeromonas spp. | 45 |
| Tabela 5 Predição Gênica de regiões codificantes pelo software Prokka e pelo RAST server..... | 45 |
| Tabela 6 Identidade dos isolados através de alinhamento de aminoácidos no BLASTp. | 46 |
| Tabela 7 Valores de DDH entre o isolado Aer593 e cepas de Aeromonas. | 51 |
| Tabela 8 Valores de DDH entre cepas controle de Aeromonas. | 52 |
| Tabela 9 Identidade Média de Nucleotídeos entre Aer593 e cepas de Aeromonas. | 53 |
| Tabela 10 Identidade Média de Nucleotídeos entre cepas controle de Aeromonas. | 54 |
| Tabela 11 Resultado dos testes bioquímicos API 20E. | 61 |
| Tabela 12 Resultado testes bioquímicos API 20NE. | 61 |
| Tabela 13 Genes de resistência a antimicrobianos encontrados nos genomas em estudo..... | 62 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------------|---|
| aa | - Aminoácidos |
| AFLP | - <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> |
| APA | - Água Peptonada Alcalina |
| ATCC | - <i>American Type Culture Collection</i> |
| BHI | - <i>Brain Heart Infusion</i> |
| BLAST | - <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| CDS | - Região Codificante |
| GC | - Guanina-Citosina |
| IAM | - Instituto Aggeu Magalhães |
| LB | - Agar Luria-Bertani |
| MALDI-TOF MS | - <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i> |
| NaOH | - Hidróxido de Sódio |
| NCBI | - <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| nt | - Nucleotídeos |
| pb | - Pares de base |
| PCR | - Reação em Cadeia da Polimerase |
| TCBS | - Agar de Tiosulfato, Citrato, BÍlis e Sacarose |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 16 |
| 2.1 O gênero <i>Aeromonas</i> e sua importância clínica | 16 |
| 2.2 Patogenicidade e fatores de virulência de <i>Aeromonas</i> | 19 |
| 2.2.1 Fatores de virulência de <i>Aeromonas</i> spp. | 19 |
| 2.2.2 Resistência antimicrobiana por <i>Aeromonas</i> spp. | 19 |
| 2.3 Taxonomia do gênero <i>Aeromonas</i> | 20 |
| 2.4 Métodos de identificação e classificação de <i>Aeromonas</i> spp. | 24 |
| 2.4.1 Identificação de <i>Aeromonas</i> spp. por testes bioquímicos..... | 24 |
| 2.4.2 Identificação de <i>Aeromonas</i> spp. por MALDI-TOF MS..... | 24 |
| 2.4.3 Identificação molecular e classificação taxonômica de <i>Aeromonas</i> spp..... | 25 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 28 |
| 4 PERGUNTA CONDUTORA | 29 |
| 5 HIPÓTESE | 30 |
| 6 OBJETIVOS | 31 |
| 6.1 Objetivo geral | 31 |
| 6.2 Objetivos específicos | 31 |
| 7 MATERIAIS E MÉTODOS | 32 |
| 7.1 Isolados do estudo | 32 |
| 7.2 Identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF MS | 32 |
| 7.3 Caracterização bioquímica dos isolados | 33 |
| 7.4 Obtenção do DNA genômico | 34 |
| 7.5 Preparo das bibliotecas | 34 |
| 7.5.1 Tagmentação..... | 34 |
| 7.5.2 Amplificação por PCR..... | 35 |
| 7.5.3 Purificação do produto de PCR | 35 |
| 7.5.4 Normalização da Biblioteca..... | 35 |
| 7.6 Quantificação das bibliotecas | 36 |
| 7.7 Sequenciamento e controle de qualidade dos <i>reads</i> | 36 |

| | |
|--|----|
| 7.8 Montagem dos genomas | 36 |
| 7.9 Predição de genes..... | 37 |
| 7.10 Análise filogenética por <i>Multilocus Phylogenetic Analysis</i> (MLPA) | 37 |
| 7.11 Reconstrução filogenética baseada no <i>core</i> genoma..... | 40 |
| 7.12 Hibridização DNA-DNA <i>in silico</i> | 40 |
| 7.13 Identidade Média de Nucleotídeos (<i>Average Nucleotide Identity</i> – ANI) | 41 |
| 7.14 Anotação de genes de resistência e virulência..... | 41 |
| 8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS | 42 |
| 9 RESULTADOS | 43 |
| 9.1 Identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF MS | 43 |
| 9.2 Sequenciamento, Montagem e Anotação dos Genomas | 44 |
| 9.3 MLPA (<i>Multilocus Phylogenetic Analysis</i>) – regiões parciais dos genes | 47 |
| 9.4 Similaridade entre genomas | 51 |
| 9.4.1 Hibridização DNA-DNA <i>in silico</i> | 51 |
| 9.4.2 Identidade média de nucleotídeos - ANI..... | 52 |
| 9.5 <i>Multilocus Phylogenetic Analysis</i> (MLPA) – utilizando regiões codificantes completas dos genes <i>housekeeping</i> | 54 |
| 9.6 Análise filogenética baseada no <i>core</i> genoma..... | 56 |
| 9.7 Análise do gene <i>gyrB</i> como marcador individual | 57 |
| 9.8 Análise do gene <i>rpoD</i> como marcador individual..... | 59 |
| 9.9 Caracterização bioquímica dos isolados..... | 61 |
| 9.10 Genes de resistência a antimicrobianos encontrados nos genomas dos isolados de <i>Aeromonas</i> spp. | 62 |
| 9.11. Presença de genes de virulência nos genomas em estudo | 63 |
| 10 DISCUSSÃO | 64 |
| 11 CONCLUSÕES..... | 70 |
| REFERÊNCIAS | 71 |
| ANEXO A - Genes parciais utilizados na técnica <i>Multilocus Phylogenetic Analysis</i> MLPA disponíveis na base de dados GenBank/NCBI..... | 79 |
| ANEXO B - Genomas utilizados para as análises do estudo disponíveis <i>Reference Sequence Database</i> /NCBI..... | 81 |

1 INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Aeromonas* possuem formato de bacilos gram-negativos, são pertencentes à classe das gammaproteobactérias. São naturais de ambiente aquático, sendo importantes patógenos de algumas espécies de peixes e conhecidas por causar grandes perdas nas atividades de piscicultura. *Aeromonas* spp. também são patógenos de outros animais, incluindo alguns anfíbios e mamíferos. Por conta disso, a pesquisa por essas bactérias é utilizada como um parâmetro de qualidade da água, já incluso em alguns países. Nos seres humanos, a manifestação clínica mais comum causada por *Aeromonas* são gastroenterites, porém, podem provocar diversos tipos de infecções como infecções de pele, no trato respiratório e urogenital, conjuntivite, peritonite e outros tipos de infecções mais graves como meningite, necrose tecidual e septicemia.

Em sua primeira caracterização, as bactérias pertencentes a esse gênero foram incluídas na família Vibrionaceae devido a similaridades fenotípicas com bactérias do gênero *Vibrio*. Com o avanço das técnicas em biologia molecular, principalmente após os avanços nas técnicas de sequenciamento do DNA, foi constatado que *Aeromonas* spp. se encontravam em posições filogenéticas distintas das bactérias pertencentes à família Vibrionaceae, levando à proposta da nova família Aeromonadaceae pertencentes à ordem Aeromonadales. Desde então, o gênero está em constante modificação não só pela descrição de novas espécies como também pela reclassificação de espécies dentro do gênero. Em laboratórios clínicos, essas bactérias são de difícil identificação em nível de espécie por conta de seu comportamento heterogêneo e os métodos mais confiáveis para classificá-las utilizando técnicas de biologia molecular.

Além da complexidade em relação à sua taxonomia, mecanismos de patogenicidade de *Aeromonas* spp. não são bem compreendidos para nenhuma das infecções humanas, sendo sua virulência considerada multifatorial devido à falta de relação entre as características fenotípicas e genotípicas das espécies. *Aeromonas* spp. também podem abrigar elementos genéticos móveis, como plasmídeos contendo genes de resistência, que favorecem a dispersão de linhagens bacterianas resistentes através de transferência horizontal.

Em estudo anterior, que deu origem à proposta desse trabalho, foram realizadas análises filogenéticas utilizando 119 isolados de *Aeromonas* spp. a partir das sequências dos genes 16S rRNA e *gyrB*, que são considerados importantes marcadores evolutivos bacterianos. Naquele estudo, dois isolados – Aer294 (clínico) e Aer593 (ambiental) – não

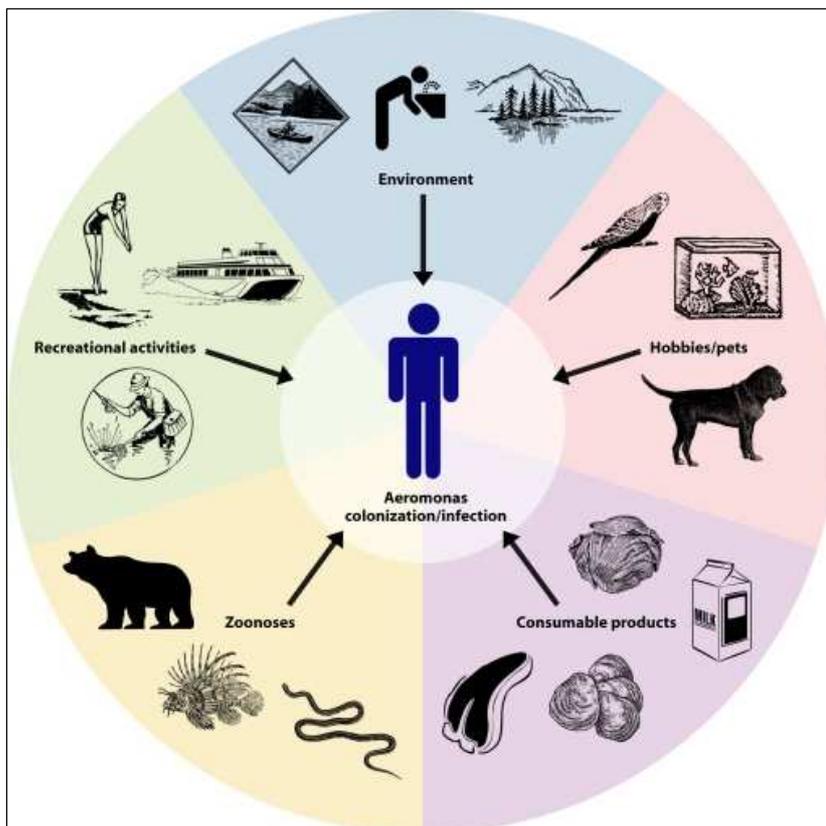
agruparam com nenhuma das espécies descritas até o momento. O presente estudo teve como objetivo realizar a classificação taxonômica dessas duas bactérias não-tipadas, esclarecendo se se tratava do surgimento de novas espécies. Para isso, foi utilizada a técnica de *Whole Genome Sequencing* (WGS), importante ferramenta em estudos de genômica estrutural e funcional. Além disso, as relações filogenéticas foram inferidas por diferentes métodos a fim de esclarecer a posição dos isolados bem como identificar a melhor forma de classificação taxonômica de isolados desse gênero bacteriano.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Aeromonas* e sua importância clínica

Aeromonas são bactérias autóctones do ambiente aquático e sua patogenicidade em animais pecilotérmicos já é discutida há bastante tempo, principalmente por causar grandes perdas nas atividades de piscicultura (GRAM et al.,1999; VON GRAEVENITZ; MENSCH, 1968). Apesar disso, essas bactérias são ubíquas na biosfera microbiana e já foram isoladas dos mais diversos sítios incluindo amostras clínicas de seres humanos, animais domésticos, alimentos e no solo. A presença dessas bactérias em grande variedade de fontes no ambiente faz com que haja constante contato com os seres humanos, podendo resultar em colonização e infecção, atuando muitas vezes como um patógeno oportunista (JANDA; ABBOTT, 2010). Na Figura 1 podem ser visualizadas as principais fontes do ambiente em que indivíduos e *Aeromonas* spp. podem interagir.

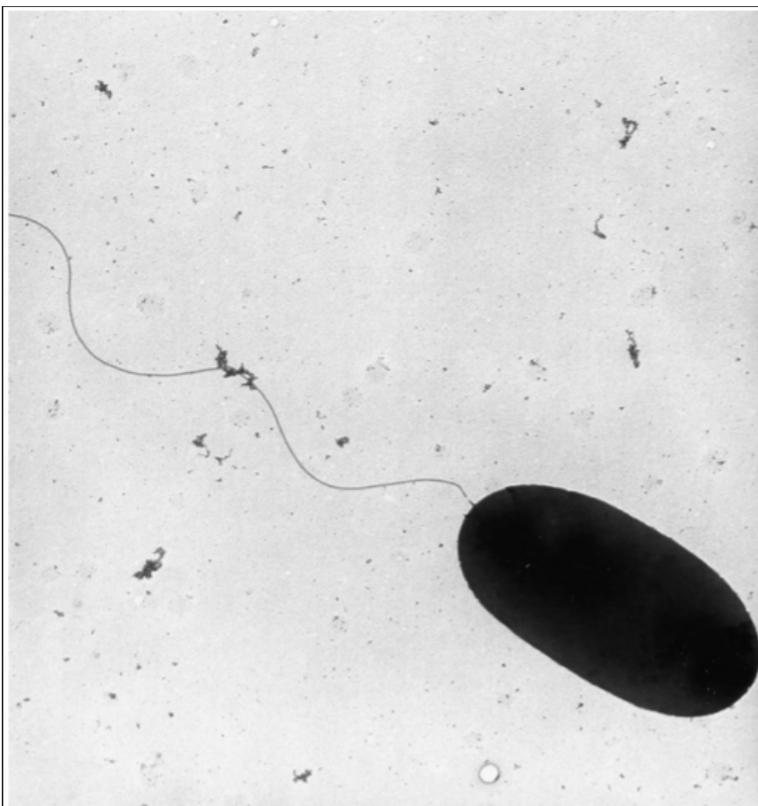
Figura 1 - Fontes ambientais de *Aeromonas* spp. com potencial de colonizar e infectar indivíduos.



Fonte: Janda e Abbott (2010).

Aeromonas são bactérias gram-negativas que podem aparecer como bacilos ou cocobacilos independentes, aos pares ou em cadeias curtas, anaeróbias facultativas, não são formadoras de esporos, não fermentam glicose, são oxidase e catalase positiva, reduzem nitrato a nitrito, são normalmente resistentes ao agente vibriostático O/129 e seu tamanho varia entre 1 e 3,5 μM (ABBOTT et al., 2003; *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*, 1996). Na 9ª edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* o gênero *Aeromonas* foi dividido em dois grupos principais: no primeiro se encontram as espécies psicrófilas, não móveis, que infectam principalmente répteis e peixes; o segundo grupo, muito maior em quantidade de espécies, engloba *Aeromonas* spp. mesofílicas móveis, associadas a um grande número de doenças no homem (PARKER; SHAW, 2011). Na Figura 2 se observa uma espécie (*Aeromonas caviae*) representante do grupo das espécies mesofílicas móveis onde é possível visualizar o seu flagelo polar único.

Figura 2 – Microscopia eletrônica de transmissão de *Aeromonas caviae* cepa Sch3N.



Fonte: Parker e Shaw (2011).

Aeromonas spp. vêm recebendo cada vez mais atenção pela comunidade médica e científica pelo grande número de infecções que causam e por estarem envolvidas em diversos tipos de infecção. A infecção mais frequentemente relatada por *Aeromonas* spp. é a gastroenterite sendo os principais sintomas náusea, vômito e diarreia líquida (IGBINOSA et al., 2012; JANDA; ABBOTT, 2010).

Apesar de nem todas as espécies desse gênero causarem diarreia, *Aeromonas* spp. devem ser tratadas como enteropatógenos, uma vez que mesmo uma exposição a baixas doses do microrganismo pode levar à infecção, ainda que estas sejam assintomáticas (TEUNIS; FIGUERAS, 2016). Outras infecções são causadas por *Aeromonas* spp., como infecções de pele e tecidos moles, intra-abdominais, no sistema pancreático e hepatobiliar, no trato respiratório, no trato urogenital e nos olhos (BRANN, 2001; CHAN et al., 2000; KHAN et al., 2007; LAMY et al., 2009; THOMSON; CREMONESINI, 2008). *Aeromonas* spp. também estão relacionadas com outras doenças invasivas que podem levar à morte, como septicemia, principalmente em imunocomprometidos, sendo indivíduos com distúrbios mieloproliferativos e doenças crônicas do fígado os que possuem mais chance de desenvolver complicações (JANDA; ABBOTT, 2010). Septicemia por *Aeromonas* spp. também estão relacionadas a indivíduos imunocomprometidos com ocupações em ambientes aquáticos como velejar e pescar (MUKHOPADHYAY et al., 2008).

As infecções por *Aeromonas* ganharam destaque em dois grandes desastres naturais: o primeiro foi após o tsunami que atingiu a Tailândia em 2004, em que duas espécies de *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophyla* e *Aeromonas veronii* bv. *sobria*) foram os patógenos mais comumente isolados em casos de infecções de pele e de tecidos moles de sobreviventes (HIRANSUTHIKUL et al., 2005), e o segundo foi após o furacão Katrina, que aconteceu nos Estados Unidos em 2005 e resultou em uma enchente do lago Pontchartrain, que inundou 80% da cidade. Amostras de água do ambiente coletadas nesse período detectaram altas concentrações de *Aeromonas* spp. (PRESLEY et al., 2006).

Um aumento no monitoramento de surtos de infecções por água contaminada tem mostrado *Aeromonas* spp. como um dos microrganismos mais prevalentes. Além disso, também se acredita que muitos outros casos sejam subnotificados (O'DWYER et al., 2016).

2.2 Patogenicidade e fatores de virulência de *Aeromonas*

2.2.1 Fatores de virulência de *Aeromonas* spp.

Muitos mecanismos de virulência são considerados para *Aeromonas* spp., incluindo produção de citotoxinas, enterotoxinas e hemolisinas (JOSEPH; CARNAHAN, 2000). Outros fatores de virulência incluem a secreção de proteínas extracelulares como amilase, quitinase, elastase, aerolisina, nuclease, gelatinase, lecitinase, lipase e proteases (NAM; JOH, 2007). Em relação às gastroenterites, principais infecções por *Aeromonas* spp., as flagelinas A e B são importantes fatores de virulência pois participam da formação do flagelo polar de *Aeromonas*, essencial para a colonização intestinal (GAVÍN et al., 2002). Porém, ainda é desconhecido quais os fatores críticos que levam ao processo infeccioso e porque esses fatores não são exclusivos de cepas reconhecidamente virulentas. O baixo número de estudos utilizando modelos animais para que esses fatores sejam estudados também dificulta o entendimento de quais características genéticas são importantes na infecção por *Aeromonas* spp. (JANDA; ABBOTT, 2010).

Além de fatores de virulência que levam à infecção em humanos, *Aeromonas* spp. também possuem a capacidade de crescer em sistemas de distribuição de água, principalmente pela produção de biofilmes (IGBINOSA et al., 2012). Com o crescente aumento no número de sequenciamento de genomas completos grande quantidade de genes e fatores de virulência podem ser identificados fazendo comparação com homólogos de outras espécies para um maior esclarecimento sobre esses fatores (SESHADRI et al., 2006).

2.2.2 Resistência antimicrobiana por *Aeromonas* spp.

Há um número crescente de dados da literatura sobre a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos entre espécies de *Aeromonas*. Uma vez que essas bactérias são encontradas naturalmente no ambiente aquático esta é a principal forma de contato entre cepas resistentes e os seres humanos, assim, favorecendo a disseminação de genes de resistência, particularmente os localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons (PIOTROWSKA; POPOWSKA, 2014).

O maior problema em relação a resistência antimicrobiana do gênero *Aeromonas* está relacionado à expressão de uma ou mais beta-lactamases que tem atividade contra grande variedade de antibióticos beta-lactâmicos, que incluem penicilinas, cefalosporinas e cefalosporinas de amplo espectro. Três classes principais de beta-lactamases mediadas por cromossomo foram reconhecidas em espécies de *Aeromonas*, as cefalosporinas classe C, as penicilinas classe D e as metalo-beta-lactamases da classe B (MBLs) de Ambler (JANDA; ABBOTT, 2010; LIBISCH et al., 2008).

Apesar da maioria dos genes de resistência a antimicrobianos encontrados para o gênero serem de resistência aos beta-lactâmicos, genes de resistência a outras importantes classes de antibióticos como quinolonas (HAN et al., 2012a), aminoglicosídeos (CARVALHO et al., 2012) e tetraciclinas (HAN et al., 2012b) também já foram identificados em *Aeromonas*. A presença de genes de resistência, particularmente nas espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*, consideradas oportunistas em relação ao homem, representam uma grande preocupação para a saúde humana (PIOTROWSKA; POPOWSKA, 2014).

2.3 Taxonomia do gênero *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas* foi proposto em 1943 e durante vários anos permaneceu incluído na família Vibrionaceae, devido a algumas semelhanças fenotípicas com *Vibrio* spp. (STAINER, 1943; POPOFF, 1984). Com os avanços nas tecnologias de sequenciamento de ácidos nucleicos, as relações filogenéticas puderam ser verificadas de forma mais fácil e confiável, sendo as moléculas de rRNAs as mais utilizadas para estabelecer relações entre os organismos (WOESE, 1987).

Nas décadas de 1980 e 1990, estudos utilizando os genes 5S rRNA e 16S rRNA demonstraram que o gênero *Aeromonas* apresentava uma posição filogenética suficientemente distante da família Vibrionaceae para constituir uma família independente, sendo proposto o nome taxonômico Aeromonadaceae (COLWELL et al., 1986; MARTINEZ-MURCIA; BENLLOCH; COLLINS, 1992a). Essa proposta foi aceita e publicada na segunda edição do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2001, permanecendo até hoje. A família Aeromonadaceae pertence à classe das Gammaproteobactérias e à ordem Aeromonadales (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005).

Este gênero encontra-se em constante mudança não somente pela descrição de novas espécies, mas também pela reclassificação de espécies anteriormente validadas (ARAVENA-ROMAN et al., 2013; COLLINS et al., 1993; HUYS; CNOCKAERT; SWINGS, 2005; SAAVEDRA; FIGUERAS; MARTÍNEZ-MURCIA, 2006). A espécie *Aeromonas aquariorum* e a *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis*, por exemplo, eram tratadas como duas espécies diferentes e, após estudos filogenéticos, foi constatado que se tratava de um único táxon e sem relação com o táxon da *A. hydrophila*, sendo sinonimizadas como *Aeromonas dhakensis* (BEAZ-HIDALGO et al., 2013). Na edição de 2005 do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology existiam 18 espécies de *Aeromonas* listadas (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005). Porém, em 2013 esse número já havia aumentado 50%, com 27 espécies descritas, sendo as últimas *Aeromonas australiensis* (ARAVENA-ROMAN et al., 2013) e *Aeromonas cavernicola* (MARTÍNEZ-MURCIA et al., 2013).

Atualmente, após a descrição das espécies *Aeromonas aquatica*, *Aeromonas finlandiensis* por Beaz-Hidalgo et al. (2015), *Aeromonas lacus* e *Aeromonas rivipollensis* por Marti e Balcázar, (2015) e outras cinco espécies, *Aeromonas lusitana* (MARTINEZ-MURCIA et al., 2016) e recentemente *Aeromonas intestinalis*, *Aeromonas enterica*, *Aeromonas crassostrea* e *Aeromonas aquatilis*, existe um total de 36 espécies descritas e suas relações evolutivas podem ser visualizadas na Figura 3 (FIGUERAS et al., 2017).

As espécies mais comumente associadas a infecções em humanos são *A. hydrophila*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas veronii* (GHENGHESH et al., 2008; JANDA; ABBOTT, 2010). No Brasil, estudos apontam *A. caviae* como a espécie mais prevalente (PEREIRA et al., 2008; PREDIGER et al., 2012).

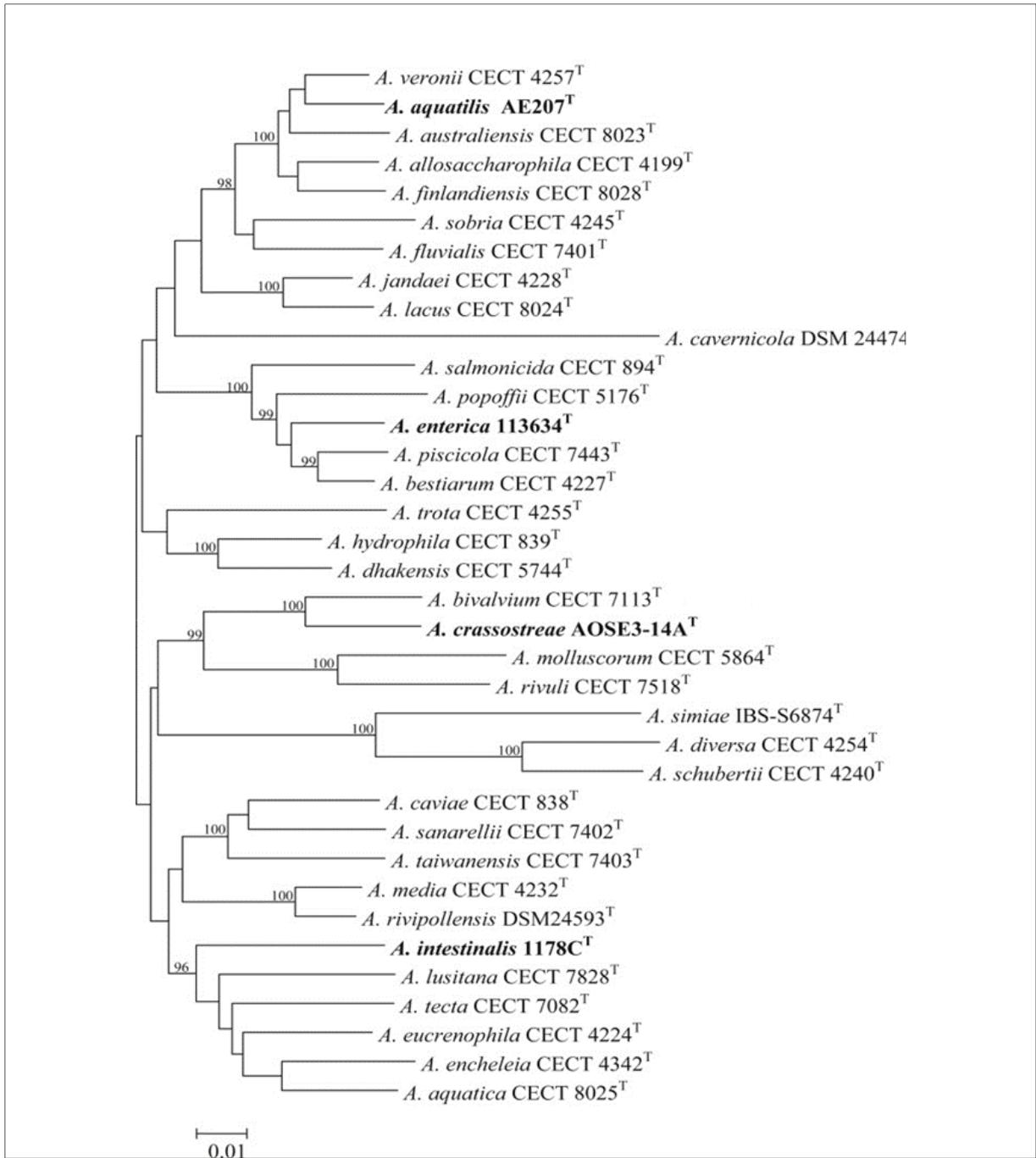
Todas as espécies atualmente reconhecidas estão posicionadas na Tabela 1 em ordem cronológica de descrição e com a nomenclatura atualmente aceita. As cepas citadas foram utilizadas como referência na descrição das últimas espécies de *Aeromonas* (FIGUERAS et al., 2017).

Tabela 1 Espécies de *Aeromonas* atualmente descritas com suas fontes de isolamento e referências.

| Espécie | Cepa | Fonte | Referência |
|-----------------------------|-------------|-----------------------------|------------------------------|
| <i>A. hydrophila</i> | CECT839 | Leite | Stainer, 1943 |
| <i>A. salmonicida</i> | CECT894 | Peixe (Salmão) | Griffin et al., 1953 |
| <i>A. sobria</i> | CECT4245 | Peixe | Popoff; Veron 1976 |
| <i>A. media</i> | CECT4232 | Peixe | Allen et al., 1983 |
| <i>A. caviae</i> | CECT838 | Porquinho-da-índia | Popoff, 1984 |
| <i>A. veronii</i> | CECT4257 | Secreção Respiratória | Hickman-Brenner et al., 1987 |
| <i>A. eucrenophila</i> | CECT4224 | Peixe | Schubert; Hegazi, 1988 |
| <i>A. schubertii</i> | CECT4240 | Abscesso cutâneo | Hickman-Brenner et al., 1988 |
| <i>A. trota</i> | CECT4255 | Fezes humanas | Schubert et al., 1990 |
| <i>A. jandaei</i> | CECT4228 | Fezes humanas | Carnahan et al., 1991 |
| <i>A. allosaccharophila</i> | CECT4199 | Peixe (Enguia) | Martinez-Murcia et al., 1992 |
| <i>A. encheleia</i> | CECT4342 | Peixe (Enguia) | Esteve et al., 1995 |
| <i>A. bestiarum</i> | CECT4227 | Peixe | Ali et al., 1996 |
| <i>A. popoffii</i> | CECT5176 | Água potável | Huys et al., 1997 |
| <i>A. dhakensis</i> | CECT 5744 | Fezes humanas | Huys et al., 2002a |
| <i>A. simiae</i> | IBS-S6874 | Fezes de macacos | Harf-Monteil et al, 2004 |
| <i>A. molluscorum</i> | CECT5864 | Molusco | Miñana-Galbis et al., 2004 |
| <i>A. bivalvium</i> | CECT7113 | Molusco | Miñana-Galbis et al., 2007 |
| <i>A. tecta</i> | CECT7082 | Fezes humanas | Demarta et al., 2008 |
| <i>A. piscicola</i> | CECT7443 | Peixe (Salmão) | Beaz-Hidalgo et al., 2009 |
| <i>A. fluvialis</i> | CECT7401 | Água (rio) | Alperi et al., 2010a |
| <i>A. sanarellii</i> | CECT7402 | Infecção de ferida | Alperi et al., 2010b |
| <i>A. taiwanensis</i> | CECT7403 | Infecção de ferida | Alperi et al., 2010b |
| <i>A. diversa</i> | CECT4254 | Infecção de ferida | Miñana-Galbis et al., 2010 |
| <i>A. rivuli</i> | CECT7518 | Água (riacho) | Figueras et al., 2011a |
| <i>A. cavernicola</i> | DSM 24474 | Água (caverna) | Martinez-Murcia et al., 2013 |
| <i>A. australiensis</i> | CECT 8023 | Água (sistema de irrigação) | Aravena-Román et al., 2013 |
| <i>A. aquatica</i> | CECT8025 | Água (lago) | Beaz-Hidalgo et al., 2015 |
| <i>A. finlandiensis</i> | CECT8028 | Água (lago) | Beaz-Hidalgo et al., 2015 |
| <i>A. lacus</i> | CECT8024 | Água (lago) | Beaz-Hidalgo et al., 2015 |
| <i>A. rivipollensis</i> | DSM24593 | Água (rio) | Marti; Balcázar, 2015 |
| <i>A. lusitana</i> | CECT7828 | Água e vegetais | Martinez-Murcia et al., 2016 |
| <i>A. intestinalis</i> | 1178C | Fezes humanas | Figueras et al., 2017 |
| <i>A. enterica</i> | 113634 | Isolado clínico | Figueras et al., 2017 |
| <i>A. crassostreae</i> | AOSE3-14A | Ostra | Figueras et al., 2017 |
| <i>A. aquatilis</i> | AE207 | Água (lago) | Figueras et al., 2017 |

Fonte: A autora

Figura 3 - Árvore filogenética (*neighbor-joining*) derivada de seqüências concatenadas dos genes *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* e *dnaX* contendo as 36 espécies atualmente descritas para o gênero *Aeromonas*.



Fonte: Adaptada de Figueras et al.(2017)

Nota: Em negrito estão as últimas espécies descritas para o gênero *Aeromonas* spp.

2.4 Métodos de identificação e classificação de *Aeromonas* spp.

2.4.1 Identificação de *Aeromonas* spp. por testes bioquímicos

As espécies de *Aeromonas* são de difícil identificação laboratorial. Embora tradicionalmente essa identificação seja feita por combinação de diferentes testes bioquímicos, os resultados muitas vezes não são conclusivos por conta do comportamento heterogêneo de algumas cepas levando a um alto índice de identificação incorreta por esses testes (ABBOTT et al., 2003).

Além da baixa confiabilidade nesse tipo de identificação, o diagnóstico não é realizado como parte da rotina da maioria dos laboratórios clínicos, pois para a identificação em nível de espécie são necessários pelo menos 18 testes, o que é financeiramente inviável para um laboratório clínico, além da demora na entrega dos resultados (GHENGHESH et al., 2008).

2.4.2 Identificação de *Aeromonas* spp. por MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS é uma técnica que permite identificação e classificação de microrganismos, incluindo os potencialmente patogênicos e por isso vem ganhando destaque na área de diagnóstico clínico sendo considerada uma técnica revolucionária para a bacteriologia (SCHUMANN; MAIER, 2014; SENG et al., 2009;). MALDI-TOF MS permite gerar um espectro de massa em picos, principalmente de proteínas ribossomais, que são moléculas conservadas, sendo esse espectro, em geral, específico para cada tipo de microrganismo. Esses picos são comparados posteriormente com uma base de dados e podem identificar família, gênero, espécie e cepas, dependendo do valor de *score* obtido e, por isso, pode permitir uma total automação para diagnósticos nos laboratórios de microbiologia clínica (PATEL, 2015).

Um estudo de Benagli et al. (2012) mostrou que MALDI-TOF MS é um método rápido e de bom custo benefício para identificação de *Aeromonas* spp. em nível de espécie e é uma boa alternativa aos métodos convencionais de identificação e classificação. Outros estudos confirmam que o MALDI-TOF MS é um método com bastante potencial para ser utilizado no diagnóstico clínico, com bons resultados para identificação de espécies bem caracterizadas do gênero *Aeromonas*, embora ressalvas sejam feitas quanto ao fato de somente

métodos de sequenciamento com análise filogenética serem seguros nessa identificação (CHEN et al., 2014; SHIN et al., 2015). Vávrová et al. (2015) destaca que para espécies mais recentemente descritas, MALDI-TOF MS não é um método confiável para identificar estas espécies e pode levar a conclusões equivocadas sobre a espécie em estudo.

2.4.3 Identificação molecular e classificação taxonômica de *Aeromonas* spp.

O sequenciamento do gene 16S rRNA é a técnica molecular mais comum para identificar o gênero e espécie bacteriana; por ser um gene bastante estável, mudanças na sua sequência o torna um bom marcador de evolução de microrganismos (JANDA; ABBOTT, 2007). Porém, para o gênero *Aeromonas* as espécies são muito semelhantes nessa sequência, suas taxas de identidade estão entre 96,7 a 100% sendo baixo o seu poder discriminatório (FIGUERAS et al., 2011b). Por exemplo, a diferença da sequência 16S rRNA de *A. caviae* e *A. trota* é de apenas 1 nucleotídeo (YÁÑEZ et al., 2003). Comparando a sequência de 16S rRNA de *A. hydrophila* subsp. *hydrophyla* (ATCC 7966T) com a *A. media* (ATCC 33907T), estas só se diferenciam em 3 nucleotídeos indicando que essas espécies são geneticamente relacionadas. Porém em estudos de hibridização DNA-DNA esses dois taxons pertencem a dois diferentes grupos de perfil de hibridização (KUIJPER, 1989; MARTINEZ-MURCIA, 1992a).

Devido à alta taxa de similaridade das sequências de 16S rRNA entre as espécies desse gênero, o sequenciamento de genes *housekeeping* com análise filogenética é a forma mais segura de se classificar *Aeromonas* spp. em nível de espécie (SHIN et al., 2015). Genes *housekeeping* são genes de cópia única sendo a porcentagem de substituição nucleotídica nesses genes, superior à do gene 16S rRNA, tornando-os essenciais não só para a identificação em nível de espécie como também para inferências filogenéticas (MARTENS et al., 2008). Estudos filogenéticos utilizando a sequência do gene *gyrB* foram realizados em diferentes gêneros bacterianos e demonstram que ele é uma alternativa eficiente ao 16S rRNA para identificação e classificação taxonômica (FUKUSHIMA et al., 2002; WANG et al., 2007).

Em um estudo de Yáñez et al. (2003), o sequenciamento do gene *gyrB*, que codifica a subunidade β da DNA girase, mostrou-se excelente na identificação de espécies e diferentes cepas do gênero *Aeromonas*, além de ser um excelente cronômetro molecular para inferências

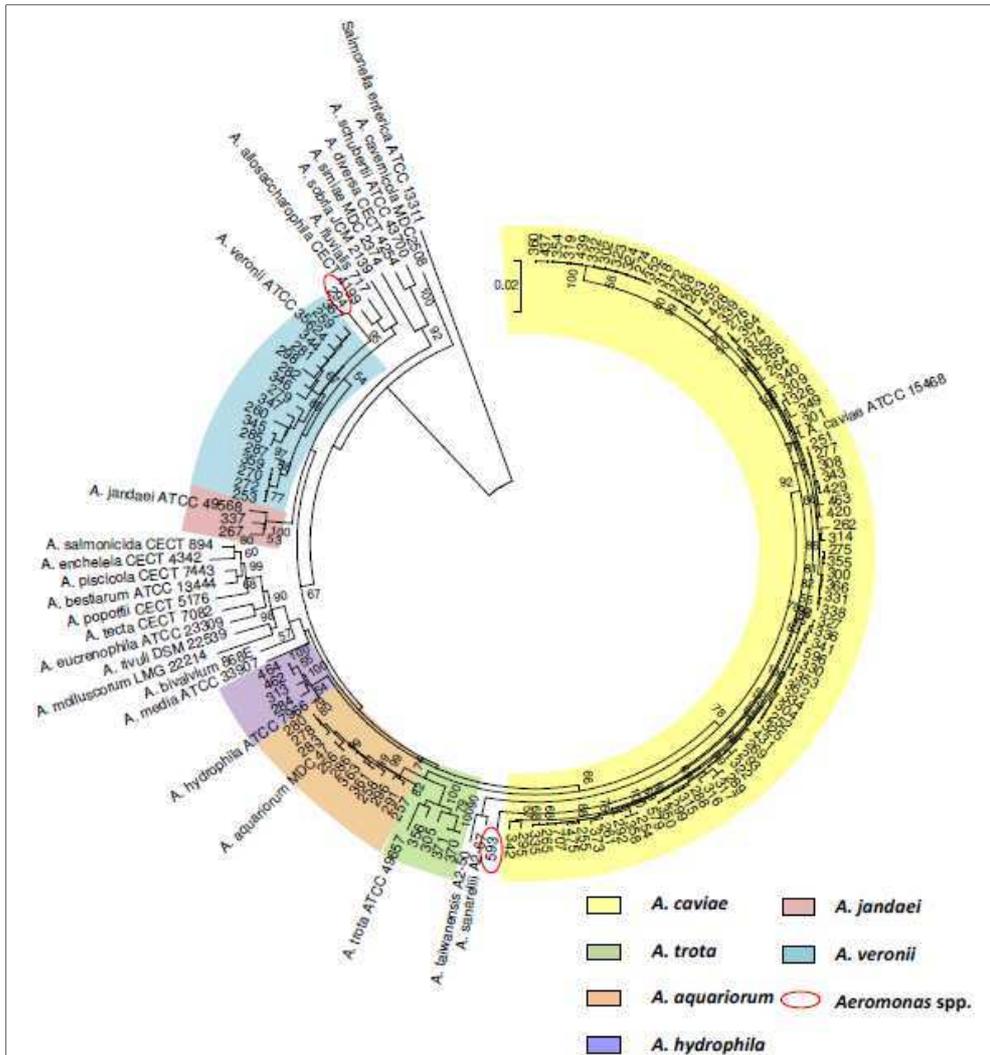
filogenéticas, com diferença entre 57 e 69 pares de bases, dependendo da cepa sequenciada. Outros estudos também confirmaram que o gene *gyrB* é um bom marcador molecular para inferir relações taxonômicas no gênero *Aeromonas* (BEAZ-HIDALGO, 2010; KUPFER et al., 2006).

Além do *gyrB* outros genes *housekeeping* são utilizados para identificação de *Aeromonas* spp., como os genes *rpoD*, *rpoB* e *recA* e *dnaJ*, representando bons marcadores moleculares para inferir relações taxonômicas no gênero (ALPERI et al., 2008; HU et al., 2012; NHUNG et al., 2007; SEPE et al., 2008).

Silva (2015) realizou análise filogenética de 119 isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* spp. através do sequenciamento dos genes 16S rRNA e *gyrB* tanto isoladamente, quanto com os dois genes concatenados, e verificou que este último método foi eficaz na classificação de espécies do gênero (Figura 4).

A análise de sequências concatenadas de cinco ou mais genes *housekeeping* tem sido utilizada na classificação de novas espécies de *Aeromonas* (ALPERI et al., 2010a; ARAVENA-ROMÁN et al., 2013) e mostram boa concordância com os métodos de hibridização DNA-DNA (ROGER et al., 2012). Na proposta das últimas quatro espécies para o gênero *Aeromonas*, inicialmente foi feita uma árvore filogenética utilizando somente o gene *rpoD*, resultando em uma árvore em que essas quatro cepas não agrupavam com nenhuma das espécies descritas para o gênero. Em uma segunda análise, utilizando sequências concatenadas de seis genes *housekeeping* (*rpoD*, *gyrB*, *gyrA*, *recA*, *dnaJ* e *dnaX*) o resultado foi semelhante ao do gene *rpoD* isolado (FIGUERAS et al., 2017), confirmando o poder de resolução na identificação e classificação taxonômica do gênero *Aeromonas* utilizando apenas esse gene, conforme já havia sido proposto por Figueras et al. (2011).

Figura 4 – Árvore filogenética circular (*neighbor-joining*) derivada das sequências concatenadas dos genes 16S rRNA e *gyrB* mostrando relação entre 119 isolados de *Aeromonas* e 26 espécies deste gênero.



Fonte: Silva (2015)

Nota: Relação entre 119 isolados de *Aeromonas* e 26 espécies do gênero e um grupo externo representado pelo gênero *Salmonella*. Duas espécies que não se agruparam com nenhuma das 26 espécies em análise se encontram circuladas em vermelho. Números próximos aos nós indicam os valores de bootstrap ≥ 50 (porcentagem de 1000 replicatas).

3 JUSTIFICATIVA

A taxonomia do gênero *Aeromonas* é bastante complexa e tem sido submetida a várias revisões devido a novas espécies descritas, reclassificação de espécies aceitas e à introdução de novos critérios de diagnóstico. Um estudo filogenético utilizando isolados de *Aeromonas* feito previamente pelo nosso grupo de pesquisas mostrou que dois isolados de *Aeromonas* não agruparam com nenhuma das espécies descritas na literatura, sugerindo que se tratavam de duas novas espécies do gênero. O objetivo deste estudo foi realizar a classificação taxonômica desses dois isolados de *Aeromonas* que não foram identificados em nível de espécie, para confirmar se eram duas novas espécies do gênero. Além disso, foram utilizadas diferentes metodologias para apontar a melhor forma de identificação e classificação de cepas desse gênero. Adicionalmente, os genomas completos foram analisados, identificando genes envolvidos com a virulência e resistência nesses isolados.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Os isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de amostras clínica e ambiental são duas novas espécies desse gênero?

5 HIPÓTESE

Dois isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de amostras clínica e ambiental apresentam diferença evolutiva com as demais espécies do gênero e são duas novas espécies desse gênero bacteriano.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

Realizar classificação taxonômica e análise genômica dos isolados Aer593 e Aer294 de *Aeromonas* spp

6.2 Objetivos específicos

- a) Identificar os isolados de *Aeromonas* spp. por espectrometria de massas MALDI-TOF MS;
- b) Obter genomas de isolados de *Aeromonas* spp.;
- c) Inferir relações filogenéticas entre isolados de *Aeromonas* spp.;
- d) Caracterizar o perfil de hibridização DNA-DNA *in silico* e de identidade média de nucleotídeos entre isolados de *Aeromonas* spp.;
- e) Avaliar a estabilidade dos genes *gyrB* e *rpoD* como marcadores taxonômicos para espécies de *Aeromonas* spp.;
- f) Avaliar a presença de genes relacionados à resistência e virulência nos genomas de *Aeromonas* spp.;
- g) Caracterizar bioquimicamente os isolados Aer593 e Aer294 de *Aeromonas* spp.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Isolados do estudo

Os isolados de *Aeromonas* deste estudo foram envolvidos em um surto de diarreia ocorrido em 2004 no município de São Bento do Una, situado no estado de Pernambuco (HOFER et al., 2006). Destes, os isolados Aer294 e Aer593 apresentaram, em estudo anterior, posições filogenéticas que indicaram que esses isolados são diferentes das espécies de *Aeromonas* relatadas na literatura até aquele momento do estudo (SILVA, 2015).

O isolado Aer294 é proveniente de uma coprocultura de um paciente e o isolado Aer593 foi obtido de ambiente aquático da cidade, durante o período do surto. Além desses dois isolados, foram incluídos no estudo outros cinco isolados clínicos representantes de diferentes espécies do gênero: Aer283 (*Aeromonas aquariorum*), Aer268 (*Aeromonas caviae*), Aer284 (*Aeromonas hydrophila*), Aer337 (*Aeromonas jandaei*) e Aer371 (*Aeromonas trola*) obtidos durante o mesmo período para serem usados como controles dos testes.

Para a preservação do material genético, os isolados estavam estocados a -80°C em agar *Brain Heart Infusion* (BHI) com 25% de glicerol, foram reativados pelo enriquecimento em Água Peptonada Alcalina (APA) a 37°C, durante 24h. Para garantir a pureza das culturas, os isolados foram semeados em meio ágar TCBS (Ágar de Tiosulfato, Citrato, BÍlis e Sacarose) a 37°C durante 24h. O ágar TCBS é seletivo para *Vibrio* spp. e espécies relacionadas, contendo altas concentrações de tiosulfato de sódio e citrato de sódio que inibe o crescimento de bactérias da família Enterobacteriaceae. Uma colônia isolada foi transferida para o meio BHI e incubada a 37°C por 24h para realização da extração do DNA genômico.

7.2 Identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF MS

Para a confirmação da identidade bacteriana por MALDI-TOF MS foi utilizado um protocolo de transferência direta de colônia. Os isolados foram crescidos por 24h em meio ágar LB e, utilizando ponteira de micropipeta estéril, uma colônia isolada de cada amostra foi brevemente tocadas e uma fina camada de microrganismo transferida para uma placa metálica de aço polido de 384 poços (*Bruker Daltonics*).

Cada poço da placa contendo microrganismo foi coberto com 1µL da solução matriz (MALDI matrix α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid [10mg/mL], acetonitrila [50% volume final]) e ácido trifluoroacético [0,3% volume final]) e, após secar por 30 minutos à temperatura ambiente as amostras foram encaminhadas para a análise.

As amostras foram colocadas no espectrômetro de massas MALDI TOF/TOF MS Bruker Daltonics-Autoflex III smartbeam (*Bruker Daltonics*, Bremen Alemanha) previamente calibrado com o Protein Calibration Standard I ao qual a solução matriz também foi adicionada. Os espectros de massas obtidos para cada amostra foram comparados com os espectros bacterianos depositados no banco de dados do software Bruker Biotyper 2.0 (*Bruker Daltonics*, Bremen Alemanha) para a identificação do gênero e/ou espécie bacteriana. Cepas ATCC de *Aeromonas* foram incluídas como controles da análise e todas as amostras foram testadas em duplicatas.

O software *Bruker Biotyper 2.0* utiliza um algoritmo de bioestatística em que esses picos são comparados com picos referência de organismos depositados em seu banco de dados. Um score $\geq 2,00$ pode ser considerado como grande probabilidade da identificação do organismo a nível de espécie, um score entre 1,700 e 1,999 é confiável apenas para a identificação do gênero do microrganismo e se o resultado for um score menor que 1,700 não é possível realizar qualquer identificação (SAFFERT et al., 2011).

7.3 Caracterização bioquímica dos isolados

Para caracterização bioquímica das amostras Aer294 e Aer593, foram utilizados os kits de identificação comercial API® 20E e 20NE (*BioMérieux*) conforme recomendações do fabricante. O API® 20E possui 21 testes bioquímicos e é capaz de identificar bactérias da família Enterobacteriaceae e outros bacilos gram-negativos. O API® 20NE contém 20 testes e identifica bacilos gram-negativos, não fastidiosos, não entéricos como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio* e *Aeromonas*. O API® 20NE combina 8 testes convencionais e 12 testes de assimilação. Ambos os testes consistem em substratos desidratados que são inoculados à suspensão bacteriana em salina (NaCl 0,85%), que reconstituem o meio. Para os testes de assimilação a suspensão bacteriana é inoculada em um meio mínimo (API AUX Medium® BioMérieux) de pH final entre 7,0-7,2, onde a bactéria cresce se for capaz de assimilar o substrato correspondente e o resultado é visualizado através de turvação do meio.

7.4 Obtenção do DNA genômico

O DNA dos isolados foi extraído com o DNeasy Blood & Tissue Kit (*Qiagen*) utilizando um protocolo específico para bactérias gram-negativas. Uma colônia isolada de cada uma das amostras foi previamente crescida por 24h em BHI a 37°C e um máximo de 2×10^9 células (aproximadamente 2000 μL) foram centrifugadas por 10 minutos a 7500 rpm. O pellet foi ressuscitado em 180 μL de tampão ATL e os demais procedimentos seguiram conforme recomendações do fabricante. Para eluição do material genético as colunas foram acopladas em tubos eppendorf, e 50 μL de H₂O milli-Q foram adicionados ao centro da membrana das colunas e foi feita uma incubação a temperatura ambiente por 1 minuto. Após esse período as colunas foram submetidas a centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm e o material genético obtido, estocado a -20°C.

Um microlitro do material genético foi submetido a quantificação em NanoDrop™ (*Uniscience*) para avaliação da pureza e em Qubit® (*Life Technologies*) para determinação da concentração.

7.5 Preparo das bibliotecas

As bibliotecas genômicas foram preparadas com os kits Nextera DNA Library Prep Kit e Nextera Index (adição dos índices) (Illumina®). O preparo das bibliotecas foi realizado em quatro passos: tagmentação, amplificação por PCR, purificação do produto de PCR e normalização das bibliotecas.

7.5.1 Tagmentação

O DNA genômico foi inicialmente diluído para ficar na concentração 0,4 ng/ μL e posteriormente foi fragmentado. Também foram adicionadas sequências adaptadoras (*tags*), que permitiram amplificação por PCR na etapa posterior. O processo de fragmentação e adição das tags foi feito simultaneamente pela ação da enzima Nextera XT transposoma. A placa de preparo das bibliotecas foi colocada no termociclador 55°C por 5 minutos e mantida

a 10°C. Ao atingir a temperatura de 10°C a placa foi submetida à neutralização pela adição do tampão neutralizante do kit (*neutralize tagment buffer*).

7.5.2 Amplificação por PCR

O DNA a ser sequenciado foi amplificado por PCR. Nessa etapa também foram adicionados os índices 1 e 2 necessários para a geração de clusters e sequenciamento das amostras. No termociclador a placa contendo as amostras foi submetida ao seguinte programa: incubação a 72°C por três minutos e depois a 95°C por 30 segundos, seguidas de 12 ciclos térmicos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C, finalizando com uma extensão final de 5 minutos a 72°C. A placa foi mantida a 10°C.

7.5.3 Purificação do produto de PCR

Nesse processo foi realizada a purificação das bibliotecas de DNA e seleção de tamanho das moléculas, fazendo com que fragmentos curtos de biblioteca fossem removidos. 20 µL de AMPure XP *beads* foram adicionadas em 50 µL do produto de PCR e a placa contendo as amostras acoplada em uma estante magnética. O sobrenadante foi removido e as *beads* contendo as amostras foram lavadas com etanol 80%. Por fim, as amostras foram ressuspensas em 52,5 µL de RSB (*ressuspension buffer*) do kit.

7.5.4 Normalização da Biblioteca

O processo de normalização garante que a quantidade de cada biblioteca gerada por amostra seja equivalente para o sequenciamento. 20 µL do produto purificado é transferido para uma nova placa e são adicionados 45 µL de aditivos de normalização LNA1 (Library Normalization Additives1) combinados com as *beads* de normalização LNB1 (Library Normalization Beads1) do kit e a placa colocada no *shaker* a 1800 rpm por 30 minutos. Posteriormente a placa foi acoplada à estante magnética, o sobrenadante removido. As amostras foram então lavadas com 45 µL LNW1 (Library Normalization Wash1) por duas

vezes e as amostras eluidas pela adição de 30 μL de 0,1 N NaOH com incubação no *shaker* a 1800 rpm por 5 minutos.

7.6 Quantificação das bibliotecas

A quantificação das bibliotecas foi realizada através de PCR em tempo real (qPCR), utilizando o kit KAPA SYBR® FAST qPCR, específico para plataformas Illumina® de sequenciamento, seguindo as recomendações do fabricante. Esse processo permitiu quantificar com precisão o número de moléculas amplificáveis na biblioteca Illumina® gerada. Cada amostra foi normalizada para a concentração de 4nM, e 15pM do pool de amostras foram utilizados na reação de sequenciamento.

7.7 Sequenciamento e controle de qualidade dos *reads*

As amostras foram sequenciadas com o sequenciador de nova geração MiSeq 2000 (Illumina®) no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do IAM utilizando o MiSeq Reagent Micro Kit v2 (Illumina®). Os fragmentos das bibliotecas foram sequenciados em ambos os sentidos (*paired-end*). Os dados brutos resultantes do sequenciamento passaram por uma verificação da qualidade através do programa FastQC (ANDREWS, 2010) que fornece uma estatística dos dados gerados, sendo possível visualizar, através de gráficos e tabelas, áreas em que podem haver problemas como sequências super-representadas, níveis de duplicação de sequências e má distribuição de tamanhos de sequências, antes de se fazer as análises genômicas pretendidas.

7.8 Montagem dos genomas

Os fragmentos de DNA obtidos pelo sequenciamento (*reads*) foram montados gerando sequências longas contínuas ou contigs. Os *reads* sequenciados passaram por um pré-processamento antes da montagem através do programa Trimmomatic (BOLGER et al., 2014) que permite remover da montagem sequências com baixa qualidade. Foram testados três tipos de cortes nos fins das sequências (onde a qualidade é menor), mantendo o número de bases

dos *reads* em 200, 220 e 240. Após esse pré-processamento as amostras foram submetidas a montagem pelo programa Velvet (ZERBINO, 2010) que permite otimização de parâmetros através do VelvetOptimiser. Também foram feitas as montagens dos *reads* a partir do dado bruto do sequenciamento, sem pré-processamento. Alternativamente foi utilizado um outro programa de montagem, o SPAdes (BANKEVICH et al., 2012) para testar um tipo diferente de algoritmo computacional visando obter o melhor número de contigs. As montagens com menor número de contigs, o que significa a menor fragmentação do genoma e maior valor de N50 (quando 50% do genoma está em contigs valor igual ou maior a este valor), foram selecionadas para as análises posteriores.

7.9 Predição de genes

As sequências codificadoras foram preditas através do RAST *server* (AZIZ, 2008) e também pelo programa Prokka (SEEMANN, 2014) para fins comparativos. Posteriormente as regiões codificantes foram visualizadas no Artemis (versão 16.0.0) (CARVER et al., 2012).

7.10 Análise filogenética por *Multilocus Phylogenetic Analysis* (MLPA)

Para análise filogenética foram obtidas, a partir do genoma completo, as sequências de seis genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* e *dnaX*) dos sete isolados e do estudo. Também foram obtidas as sequências desses genes de cada uma das 36 espécies do gênero *Aeromonas* descritas até o momento (números de acesso disponíveis no Anexo A) no GenBank do NCBI.

As sequências de nucleotídeos dos seis genes *housekeeping* foram alinhadas separadamente pela ferramenta Muscle (EDGAR, 2004) e os alinhamentos submetidos ao programa Gblocks (CASTRESANA, 2000), que elimina posições mal alinhadas e regiões divergentes do DNA, tornando as sequências mais apropriadas para análise filogenética. Foram utilizadas sequências de 908 pb do gene *gyrB*, 561 pb do gene *rpoD*, 598 pb do gene *recA*, 730 pb do gene *dnaJ*, 291 pb do gene *gyrA* e 213 pb do gene *dnaX*, uma vez que esses foram os tamanhos máximos obtidos igualmente para todas as cepas de referência de *Aeromonas* disponíveis no GenBank do NCBI. As sequências foram posteriormente

concatenadas, resultando em 3301 pb que seguiram para a análise filogenética. Conforme metodologia de Martinez-Murcia et al. (2011), as estimativas de divergência evolutiva e os agrupamentos foram obtidos utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros (KIMURA, 1980) e a árvore filogenética foi construída pelo método de *neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987), disponível no programa MEGA, versão 7 (KUMAR et al., 2016).

O alinhamento resultante também foi submetido à ferramenta JmodelTest (DARRIBA et al., 2012), que faz uma seleção estatística dos melhores modelos de substituição nucleotídica, para um determinado alinhamento específico. Uma segunda árvore filogenética foi construída pelo método de máxima verossimilhança, com o modelo de substituição nucleotídica GTR (*General Time Reversible*) também através do programa MEGA, versão 7 (KUMAR et al., 2016), a fim de verificar a concordância dos resultados entre esses dois métodos de inferência filogenética. A estabilidade das relações, ou seja, a confiabilidade da topologia das árvores, tanto por *neighbor-joining* quanto por máxima verossimilhança, foi obtida por *bootstrap* de 1000 replicatas.

Para fins confirmatórios sobre as posições das cepas Aer294 e Aer593, genomas de referência de cada uma das espécies de *Aeromonas* disponíveis e nove genomas da espécie *A. caviae* foram obtidos a partir da base de dados de genomas bacterianos do NCBI. As regiões codificantes completas do genoma foram preditas através do *software* Prokka (SEEMANN, 2014) e visualizadas no Artemis (versão 16.0.0) (CARVER et al., 2012) conforme descrito no tópico 1.15. As regiões codificantes completas dos genes *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* e *dnaX* foram obtidas, resultando num alinhamento total de 10.404 pb sendo de 2385 pb do gene *gyrB*, 1815 pb do gene *rpoD*, 1016 pb do gene *recA*, 1125 pb do gene *dnaJ*, 2583 pb do gene *gyrA* e 1480 pb do gene *dnaX*. As sequências de nucleotídeos desses seis genes *housekeeping* também foram alinhadas separadamente pela ferramenta Muscle, os alinhamentos submetidos ao programa Gblocks, as estimativas de divergência evolutiva obtidas utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros e a árvore filogenética foi construída pelo método de *neighbor-joining*, disponível no programa MEGA, versão 7.

Árvores individuais para o gene *gyrB* (2385 pb) e *rpoD* (1815 pb) também foram geradas a fim de testar esses genes como marcadores individuais para identificação bacteriana.

A cepa *Salmonella enterica* ATCC 13311T, foi utilizada como grupo externo das relações filogenéticas por apresentar estreita relação com o gênero *Aeromonas*.

7.11 Reconstrução filogenética baseada no *core* genoma

Para confirmar a posição filogenética do isolado Aer593 foi feita uma reconstrução filogenética baseada no *core* genoma de Aer593 juntamente com 12 genomas da espécie *Aeromonas caviae* e genomas de outras 7 espécies mais estreitamente relacionadas à espécie *A. caviae*, sendo estas *A. media*, *A. encheleia*, *A. tecta*, *A. aquatica*, *A. eucrenophila*, *A. sanarellii* e *A. taiwanensis* (número de acesso dos genomas no Anexo B). Para essa análise foi requerida anotação genômica através do *software* Prokka (SEEMANN, 2014) e para a reconstrução filogenética foi utilizado o *software* Roary (<https://sanger-pathogens.github.io/Roary/>) versão 3.6.1 (PAGE et al., 2015). O *core* genoma obtido foi de 863 genes entre os genomas utilizados e através do alinhamento desses genes uma árvore filogenética foi gerada e posteriormente visualizada no programa MEGA, versão 7 (KUMAR et al., 2016).

7.12 Hibridização DNA-DNA *in silico*

A hibridização DNA-DNA *in silico* foi utilizada para estimar a semelhança entre dois genomas em estudo. A hibridização DNA-DNA *in silico* (isDDH) foi realizada através do *Genome to Genome Distance Calculator* (GGDC) (MEIER-KOTLOFF et al., 2013). O *upload* dos genomas foi feito no *GGDC 2.1 Web interface* – disponível em: <http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>, conforme descrito por Beaz-Hidalgo et al. (2015). Esse serviço *web* calcula a distância entre genomas e converte esse resultado em valores de similaridade correlativos ao DDH, dando suporte à identificação de cepas, quando comparadas com genomas de cepas conhecidas. Esse cálculo de distância é feito sob três diferentes fórmulas, sendo a fórmula 2 a recomendada, uma vez que esta soma todas as identidades encontradas em *High-scoring sequence pair* (HSPs) ou segmentos de alta pontuação e divide pelo comprimento total dessas HSPs. Esse método permite a utilização de genomas incompletos em formato de *draft* e é independente do tamanho genômico (MEIER-KOLTHOFF, 2013)

A hibridização *in silico*, realizada através do *Genome-to Genome Distance Calculator* (GGDC) tem como seu limite de delimitação de espécies $\geq 70\%$ (MEIER-KOLTHOFF et al. 2013). Os genomas das cepas em estudo foram comparados com seus respectivos genomas de cepas referência depositados no banco de dados do NCBI (Anexo B).

7.13 Identidade Média de Nucleotídeos (*Average Nucleotide Identity* – ANI)

A identidade média de nucleotídeos é uma metodologia que permite a comparação de pares de genomas, através da similaridade de sequências por BBHs - *bi-directional best hits*. Os genomas em estudo são fragmentados em 1.020 nucleotídeos e posteriormente alinhados com um genoma de referência, através do algoritmo do BLAST, calculando a identidade média de nucleotídeos entre os genomas em análise. Para essa metodologia, valores com identidade resultante $\geq 95\%$ indicam que os genomas analisados pertencem ao mesmo gênero e espécie bacteriana (GORIS et al., 2007), essa ferramenta permite não só a comparação de genomas completos como também permite comparação de genomas em formato de *draft*.

Os genomas das cepas em estudo foram comparados com genomas de cepas conhecidas depositadas no banco de dados do NCBI (Anexo B) através do *ANI calculator*, disponível em: <http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/> (KONSTANTINIDIS; TIEDJE 2005).

7.14 Anotação de genes de resistência e virulência

Os *contigs* montados foram analisados pelo ResFinder 3.0 do *Center of Genomic Epidemiology Services*, disponível em: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder> (ZANKARI et al., 2012), para verificar a possível presença de genes de resistência nos isolados em estudo. Os genes relacionados à virulência foram preditos através da anotação automática do RAST *server* (AZIZ, 2008).

8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As amostras bacterianas foram cedidas pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, BioManguinhos/Fiocruz, antigo laboratório de referência para cólera e outras enteroinfecções. Atualmente essa coleção faz parte do acervo biológico do Instituto Aggeu Magalhães e tanto as amostras ambientais quanto as amostras clínicas são identificadas com numeração, sem qualquer referência ao paciente do qual a bactéria foi isolada.

9 RESULTADOS

9.1 Identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF MS

Os resultados da identificação por MALDI-TOF MS juntamente com seus respectivos *scores* podem ser visualizados na Tabela 2 e foram comparados com resultados de testes moleculares prévios de Silva (2015).

Tabela 2 Identificação de isolados de *Aeromonas spp.* por MALDI-TOF MS.

| Nº do Isolado | Filogenia 16SrRNA- <i>gyrB</i> (Silva, 2015) | Resultado MALDI-TOF MS | Score Maldi-TOF MS |
|---------------|---|----------------------------------|--------------------|
| Aer294 | <i>Aeromonas spp.</i> | <i>Aeromonas ichthiosmia</i> * | 2,013 |
| Aer593 | <i>Aeromonas spp.</i> | <i>Aeromonas caviae</i> | 2,189 |
| Aer283 | <i>Aeromonas dhakensis</i> | <i>Aeromonas media</i> | 1,912 |
| Aer268 | <i>Aeromonas caviae</i> | <i>A. caviae</i> | 2,148 |
| Aer284 | <i>Aeromonas hydrophila</i> | <i>A. hydrophila</i> | 2,315 |
| Aer337 | <i>Aeromonas jandaei</i> | <i>A. jandaei</i> | 2,041 |
| Aer371 | <i>Aeromonas trota</i> ** | <i>Aeromonas enteropelogenes</i> | 2,03 |

Fonte: A autora

Nota: *Aeromonas ichthiosmia* é sinônimo de *Aeromonas veronii* e *Aeromonas trota* é sinônimo de *Aeromonas enteropelogenes*.

Todos as espécies utilizadas como controle desse estudo resultaram por MALDI-TOF-MS um *score* >2,00 o que significa bom nível de confiabilidade para identificação de gênero e espécie. Aer268 foi identificada como *Aeromonas caviae*, Aer284 foi identificada como *Aeromonas hydrophila*, Aer337 como *Aeromonas jandaei* e a amostra 371 que foi identificada por MALDI-TOF-MS como *Aeromonas enteropelogenes* no estudo de Huys; Denys e Swings (2002) foi visto que *A. enteropelogenes* é sinônimo de *Aeromonas trota* se tratando, portanto, do mesmo táxon. Apenas o isolado Aer283 apresentou um *score* não-confiável para identificação em nível de espécie por MALDI-TOF MS (*score* < 2,00), sendo identificado como *Aeromonas media* enquanto nos testes moleculares este isolado foi identificado como *Aeromonas dhakensis*.

O resultado da identificação por MALDI-TOF MS para as espécies Aer294 e Aer593, que não agruparam anteriormente com nenhuma das espécies para o gênero *Aeromonas*, está em concordância com as espécies com que essas duas mais se aproximaram por análise

filogenética no estudo de Silva (2015). A Aer294 resultou por MALDI-TOF MS como sendo *Aeromonas ichthiosmia* que conforme análises de Huys; Kämpfer; Swings (2001) é sinônimo de *Aeromonas veronii*; já a Aer593 teve como resultado por MALDI-TOF *Aeromonas caviae*.

9.2 Sequenciamento, Montagem e Anotação dos Genomas

Após o preparo das bibliotecas as amostras foram submetidas ao sequenciamento de genoma completo no MiSeq 2000 (Illumina®). Todos os *reads* gerados passaram no controle de qualidade feito pelo programa de bioinformática *FastQC* e estavam aptos para as subsequentes análises. Após passarem pelo controle de qualidade os *reads* foram submetidos à montagem em *contigs* por diferentes programas de bioinformática conforme o item 5.6. O resultado pode ser visualizado na Tabela 3, onde as células em negrito representam o *contig* resultante que foi submetido à predição. O programa *Spades* resultou no menor número de *contigs* para os isolados Aer294, Aer593, Aer283 (*Aeromonas aquariorum*) e Aer337 (*Aeromonas jandaei*). O programa *VelvetOptimizer* com *reads* trimados em 200 resultou nos melhores *contigs* para Aer268 (*Aeromonas caviae*) e Aer284 (*Aeromonas hydrophila*) e o *VelvetOptmiser* com trimagem em 220 resultou no menor número de *contigs* para o isolado Aer371 (*Aeromonas trota*). Nenhum *scaffold* foi gerado, o que indica que, embora montados, os genomas ainda se encontram consideravelmente fragmentados.

Com os genomas montados, foi feita a predição conforme o item 7.8. Com a predição foi possível determinar o tamanho dos genomas em quantidade de bases, valor de N50 e a porcentagem do conteúdo GC que estão representados na Tabela 4. O tamanho dos genomas, assim como seus respectivos conteúdos GC possuem resultados semelhantes aos últimos *drafts* de genoma de *Aeromonas* publicados (CARDOZO et al., 2016; EHSANI et al., 2016). Na tabela 5 está descrita a quantidade de prováveis regiões codificantes (CDS) preditas pelo RAST *server* e pelo programa *Prokka*.

Tabela 3 Número de *contigs* resultantes por diferentes montagens genômicas.

| TOTAL CONTIGS | Aer294 | Aer593 | Aer283 | Aer268 | Aer284 | Aer337 | Aer371 |
|------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| VelvetOptimiser Trimagem 240 | 1824 | 994 | 376 | 639 | 635 | 575 | 315 |
| VelvetOptimiser Trimagem 220 | 1711 | 886 | 935 | 620 | 203 | 518 | 280 |
| VelvetOptimiser Trimagem 200 | 2133 | 771 | 361 | 612 | 198 | 470 | 326 |
| Velvet | 1472 | 709 | 563 | 945 | 778 | 671 | 466 |
| SPAdes | 558 | 255 | 194 | 1573 | 244 | 111 | 1992 |

Fonte: A autora

Tabela 4 Tamanho dos genomas, valor de N50 e conteúdo GC dos isolados de *Aeromonas spp.*

| GENOMAS | Aer294 | Aer593 | Aer283 | Aer268 | Aer284 | Aer337 | Aer371 |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Quantidade de bases | 4641951 | 4313894 | 4739820 | 4542721 | 4819795 | 4707741 | 4325934 |
| N50 | 25103 | 48422 | 80856 | 10287 | 20771 | 170375 | 14970 |
| Conteúdo GC | 57,60% | 61,80% | 61,90% | 61,20% | 61,30% | 58,60% | 60,00% |

Fonte: A autora

Tabela 5 Predição Gênica de regiões codificantes pelo software Prokka e pelo RAST *server*.

| PREDIÇÃO GÊNICA | Aer294 | Aer593 | Aer283 | Aer268 | Aer284 | Aer337 | Aer371 |
|------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Prokka | 4309 | 3926 | 4257 | 4322 | 4497 | 4396 | 4072 |
| RAST <i>server</i> | 4198 | 3897 | 4216 | 4106 | 4303 | 4266 | 3872 |

Fonte: A autora

Após a predição gênica, os genomas foram visualizados no programa Artemis, e as sequências de nucleotídeos e aminoácidos dos genes *gyrB* e *rpoD* dos sete isolados foram obtidas. As sequências de aminoácidos desses genes foram comparadas com a base de dados do BLASTp no NCBI e a identidade foi calculada, conforme demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 Identidade dos isolados através de alinhamento de aminoácidos no BLASTp.

| Nº do Isolado | Filogenia 16SrRNA- <i>gyrB</i> (Silva, 2015) | Identidade pelo <i>gyrB</i> BLASTp | Identidade pelo <i>rpoD</i> BLASTp |
|---------------|--|--|--|
| Aer294 | <i>Aeromonas</i> spp. | <i>Aeromonas australiensis</i> - 100% | <i>Aeromonas australiensis</i> - 99% |
| Aer593 | <i>Aeromonas</i> spp. | <i>Aeromonas caviae</i> - 99% | <i>Aeromonas caviae</i> - 99% |
| Aer283 | <i>Aeromonas dhakensis</i> | <i>Aeromonas dhakensis</i> - 99% <i>Aeromonas hydrophila</i> - 99% | <i>Aeromonas hydrophila</i> - 99% <i>Aeromonas aquática</i> - 99% |
| Aer268 | <i>Aeromonas caviae</i> | <i>Aeromonas caviae</i> - 100% | <i>Aeromonas taiwanensis</i> - 99% <i>Aeromonas sanarellii</i> - 99% <i>Aeromonas media</i> - 99% <i>Aeromonas hydrophila</i> - 99% <i>Aeromonas encheleia</i> - 99% |
| Aer284 | <i>Aeromonas hydrophila</i> | <i>Aeromonas hydrophila</i> - 99% | <i>Aeromonas hydrophila</i> -100% <i>Aeromonas media</i> - 99% <i>Aeromonas aquatica</i> - 99% |
| Aer337 | <i>Aeromonas jandaei</i> | <i>Aeromonas jandaei</i> -99% <i>Aeromonas lacus</i> - 99% | <i>Aeromonas jandaei</i> -99% <i>Aeromonas sanarellii</i> - 99% <i>Aeromonas media</i> - 99% |
| Aer371 | <i>Aeromonas trota</i> * | <i>Aeromonas enteropelogenes</i> - 99% <i>Aeromonas dhakensis</i> - 99% | <i>Aeromonas enteropelogenes</i> - 100% <i>Aeromonas lacus</i> - 99% |

Fonte: A autora.

Nota: *Aeromonas trota* é sinônimo de *Aeromonas enteropelogenes*

Além de obter as porcentagens de identidade pelo BLASTp, foi realizado um alinhamento global através do programa *Needle* dos genes *gyrB* e *rpoD* do isolado Aer294 com *Aeromonas australiensis* (número de acesso no NCBI para os genes *gyrB* e *rpoD* de *A. australiensis*, respectivamente: NZ_CDDH01000074 e NZ_CDDH01000001).

Para o gene *gyrB*, 803 aminoácidos foram alinhados e o resultado de identidade e similaridade foi de 100%. Para o gene *rpoD*, 618 aminoácidos foram alinhados e o resultado

foi de 99,7% de identidade e similaridade, diferindo em apenas um aminoácido localizado na posição 226.

Fazendo a mesma análise, comparando dessa vez *Aeromonas australiensis* com *Aeromonas veronii* (espécie mais estreitamente relacionada com *A. australiensis*), o resultado do gene *gyrB* para identidade foi de 99% e de similaridade 99,5% e para o gene *rpoD* a identidade foi 99% e a similaridade 99,4%. Três diferentes cepas de *A. veronii* foram testadas e obtiveram o mesmo resultado (número de acesso no NCBI: ANB53444, KRW20818 e KRV68453).

Apesar das taxas de identidade e similaridade dos genes *gyrB* e *rpoD* mostrarem estreita relação entre essas espécies, Aer294 parece ser idêntica a *A. australiensis*. Essa espécie foi descrita na época do estudo filogenético prévio de Silva (2015) e não havia sequências de tamanhos compatíveis disponíveis para as análises e por isso essa espécie não entrou naquele estudo e por essa razão, o isolado Aer294 não agrupou com nenhuma das espécies naquele momento. Por outro lado, o isolado Aer593 obteve 99% de identidade com a espécie *Aeromonas caviae*, espécie que mais se aproxima na árvore filogenética, apesar de formar um ramo distinto.

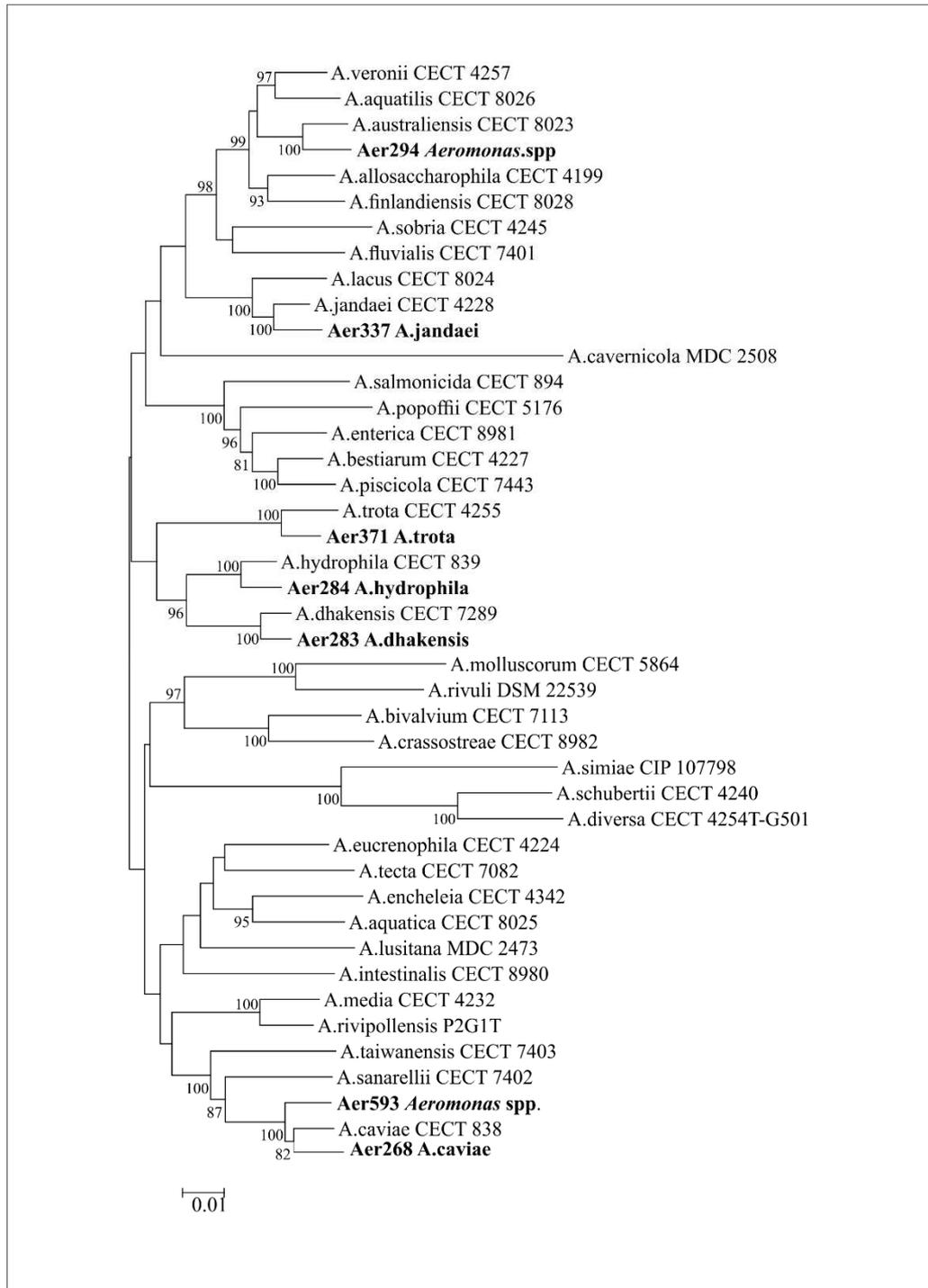
9.3 MLPA (*Multilocus Phylogenetic Analysis*) – regiões parciais dos genes

A árvore filogenética gerada a partir das sequências contínuas (3301 nt) dos genes *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* e *dnaX* dos sete isolados de *Aeromonas* e suas relações com as 36 cepas de referência deste gênero, através do método de *neighbor-joining* pode ser visualizada na Figura 5. Os isolados em estudos estão em destaque (negrito). É possível observar que o isolado Aer294 agrupou com a espécie *Aeromonas australiensis*, confirmando a identidade deste isolado, portanto, não se tratando de uma nova espécie como foi inicialmente sugerido.

Por essa metodologia, o isolado Aer593, formou um ramo monofilético independente das demais espécies, sendo esta mais uma forte evidência de que este isolado seria uma nova espécie do gênero *Aeromonas*. Todas as espécies controle desse estudo - Aer283 (*Aeromonas dhakensis*), Aer268 (*Aeromonas caviae*), Aer284 (*Aeromonas hydrophila*), Aer337 (*Aeromonas jandaei*), Aer371 (*Aeromonas trola*) agruparam com suas respectivas espécies de referência – *A. dhakensis* CECT 5744, *A. caviae* CECT 838, *A. hydrophila* CECT 839, *A.*

jandaei CECT 4228, *A. trota* CECT 4255 e com altos valores de *bootstrap* (>80%) para 1000 replicatas, o que garante alta confiabilidade desses resultados.

Figura 5 – Árvore filogenética (*neighbor-joining*) derivada de seqüências parciais dos genes *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* e *dnaX* concatenadas.

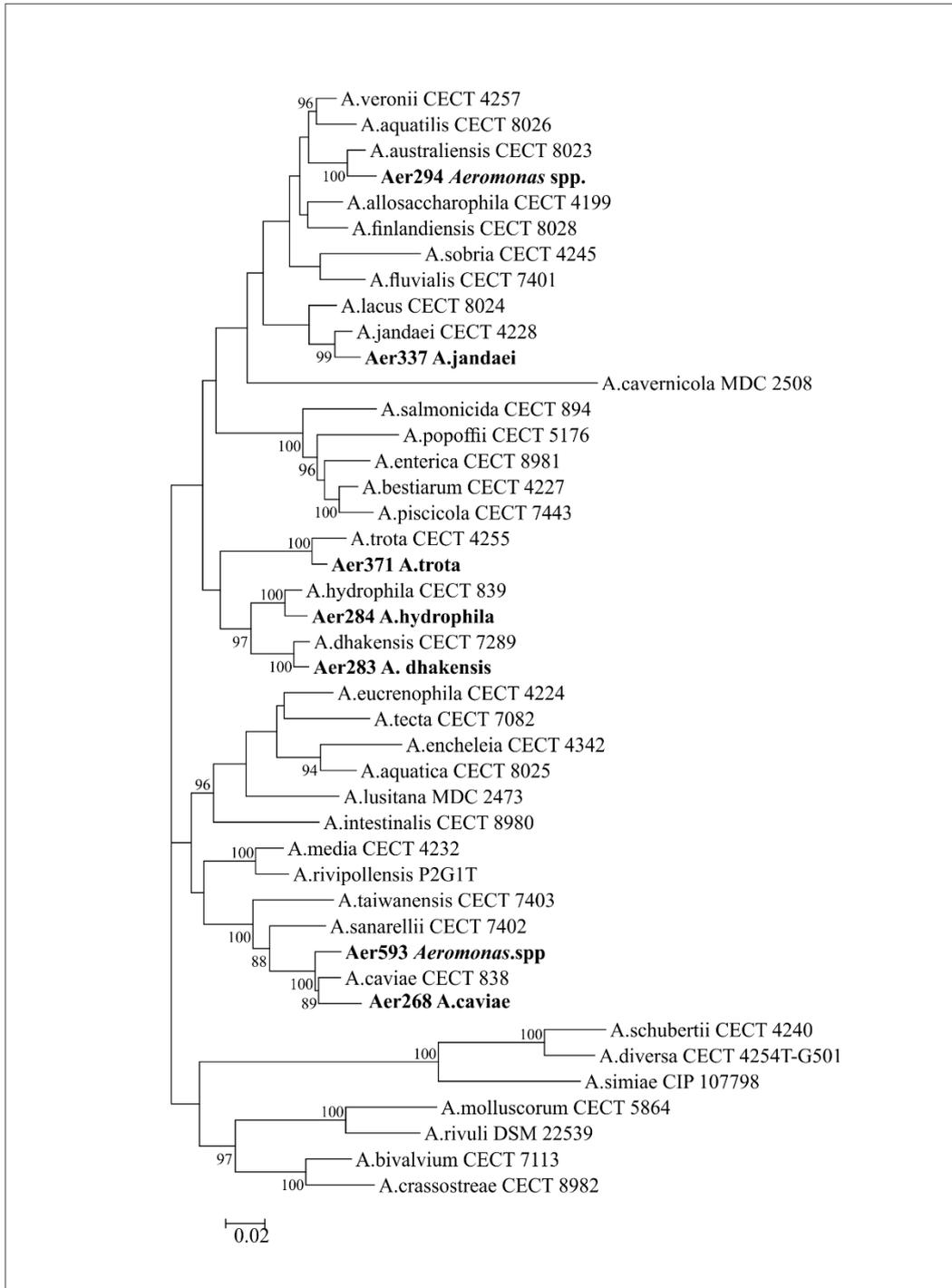


Fonte: A autora

Nota: Relação dos sete isolados de *Aeromonas* em estudo (em negrito) em estudo e 36 cepas de referência de espécies do gênero. Números próximos aos nós indicam os valores de *bootstrap* (porcentagem de 1000 replicatas).

O mesmo resultado foi observado através da inferência filogenética por máxima verossimilhança, que pode ser visualizado na Figura 6.

Figura 6 – Árvore filogenética (máxima-verossimilhança) derivada de seqüências parciais dos genes *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* e *dnaX* concatenadas.



Fonte: A autora

Nota: Relação dos sete isolados de *Aeromonas* em estudo (em negrito) em estudo e 36 cepas de referência de espécies do gênero. Números próximos aos nós indicam os valores de *bootstrap* (porcentagem de 1000 replicatas).

9.4 Similaridade entre genomas

Tanto a hibridização DNA-DNA *in silico* quanto a Identidade Média de Nucleotídeos são importantes ferramentas de comparações genômicas e fundamentais para taxonomia de procariotos.

Para confirmar se tratava-se de uma nova espécie bacteriana o genoma do isolado Aer593 foi comparado com genomas de *Aeromonas caviae* disponíveis na base de dados do NCBI, visto que essa foi a espécie com a qual esse isolado mais se aproximou na análise filogenética. As cepas *Aeromonas sanarellii* e *Aeromonas taiwanensis* também foram incluídas nesta análise, visto que são as espécies mais próximas de *A. caviae* nas relações filogenéticas.

9.4.1 Hibridização DNA-DNA in silico

Os resultados estão representados de forma resumida na Tabela 7, e mostram resultados comparativos entre o isolado Aer593 e 11 cepas de *A. caviae* disponíveis no banco de dados do NCBI, bem como a comparação com as espécies *A. sanarellii* e *A. taiwanensis*.

Tabela 7 Valores de DDH entre o isolado Aer593 e cepas de *Aeromonas*.

| ESPÉCIE | CEPA | DDH | DIST. | DDH>70% |
|------------------------------|-------------|--------|--------|---------|
| <i>Aeromonas caviae</i> | 8LM | 85.10% | 0,0175 | 93.79% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | A23 | 83.20% | 0.0197 | 92.74% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | Ae398 | 82.40% | 0.0206 | 92.26% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | BHW65 | 81.90% | 0.0212 | 91.91% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | CECT838 | 82.00% | 0.0210 | 92.03% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | CECT4221 | 81.60% | 0.0215 | 91,76% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | CH129 | 84.10% | 0.0186 | 93.27% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | CHZ306 | 84.10% | 0.0186 | 93.27% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | FDAARGOS_75 | 81.50% | 0.0216 | 91.69% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | L12 | 81.70% | 0.0214 | 91.78% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | YL12 | 81.30% | 0.0218 | 91.56% |
| <i>Aeromonas sanarellii</i> | LMG24682 | 40.2% | 0.0988 | 2.84% |
| <i>Aeromonas taiwanensis</i> | LMG24683 | 37.90% | 0.1067 | 1.57% |

Fonte: A autora.

Legenda: DDH= Valor estimado de hibridização. Dist.= Distância evolutiva. DDH>70% = Probabilidade de pertencerem a mesma espécie.

Em todas as análises comparando o isolado Aer593 com diferentes cepas de *A. caviae* os valores de DDH superiores a 70% foram encontrados para todas as cepas, variando entre 81,3% e 85,1% sugerindo que esse isolado pertence à espécie *A. caviae*. Quando o isolado Aer593 foi comparado com as duas espécies mais intimamente relacionadas à espécie *A. caviae*, esse valor foi de 40,2% para *A. sanarellii* e 37,9% para *A. taiwanensis*, o que fortalece a hipótese de que o isolado Aer593 pertence à espécie *A. caviae*, sendo, portanto, um resultado contrário ao do MLPA com seis genes *housekeeping*.

Os genomas de Aer294 (*Aeromonas australiensis*), Aer283 (*Aeromonas dhakensis*), Aer284 (*Aeromonas hydrophila*), Aer337 (*Aeromonas jandaei*), Aer371 (*Aeromonas trota*) foram comparados com os genomas mais representativos disponíveis para cada uma dessas espécies na base de dados do NCBI. Os resultados estão representados de forma resumida no Tabela 8. Todos os isolados tiveram resultados de DDH >70%, dando suporte aos resultados da filogenia.

Tabela 8 Valores de DDH entre cepas controle de *Aeromonas*.

| ISOLADO | ESPÉCIE | CEPA REFERÊNCIA | DDH | DIST. | DDH>70% |
|---------|--------------------------------|--------------------|--------|--------|---------|
| Aer294 | <i>Aeromonas australiensis</i> | CECT 8023 | 71.50% | 0.0341 | 80.86% |
| Aer283 | <i>Aeromonas dhakensis</i> | AAK1 | 76.60% | 0.0274 | 87.55% |
| Aer284 | <i>Aeromonas hydrophila</i> | ATCC 7966 | 72.90% | 0.0321 | 83.07% |
| Aer337 | <i>Aeromonas jandaei</i> | CECT 4228 | 71.40% | 0.0342 | 80.77% |
| Aer371 | <i>Aeromonas trota</i> | 4255T | 72.50% | 0.0327 | 82.39% |

Fonte: A autora.

Legenda: DDH= Valor estimado de hibridização. Dist.= Distância evolutiva. DDH>70%= Probabilidade de as duas cepas pertencerem a mesma espécie bacteriana.

9.4.2 Identidade média de nucleotídeos - ANI

A tabela 9 mostra resultados de ANI comparativos entre o isolado Aer593 e 11 cepas de *A. caviae* disponíveis no banco de dados do NCBI, bem como a comparação com as espécies *A. sanarellii* e *A. taiwanensis*.

Tabela 9 Identidade Média de Nucleotídeos entre Aer593 e cepas de *Aeromonas*.

| ESPÉCIE | CEPA | ANI% |
|------------------------------|-------------|--------|
| <i>Aeromonas caviae</i> | 8LM | 98.25% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | A23 | 98.12% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | Ae398 | 97.96% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | BHW65 | 97.87% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | CECT838 | 97.89% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | CECT4221 | 97.92% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | CH129 | 98,14% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | CHZ306 | 98.14% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | FDAARGOS_75 | 97.84% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | L12 | 97.86% |
| <i>Aeromonas caviae</i> | YL12 | 97.85% |
| <i>Aeromonas sanarellii</i> | LMG24682 | 89.93% |
| <i>Aeromonas taiwanensis</i> | LMG24683 | 89.13% |

Fonte: A autora

Os resultados de ANI entre Aer593 e as cepas de *A. caviae* variaram entre 97,84% e 98,25%. Todos os valores foram superiores a 95%, o que indica que o isolado Aer593 pertence à espécie *A. caviae*. Quando comparado com os genomas das espécies *A. sanarellii* e *A. taiwanensis*, os resultados obtidos foram inferiores a 95%, sendo 89,93% e 89,13% respectivamente, estando, portanto, em acordo ao que se espera quando se comparam com genomas de diferentes espécies. Estes dados confirmam os dados do GGDC–DDH e a identificação do isolado Aer593 como *A. caviae*, porém, é um resultado antagônico ao resultado da análise filogenética inferida anteriormente.

A identidade média de nucleotídeos dos genomas de Aer294 (*Aeromonas australiensis*), Aer283 (*Aeromonas dhakensis*), Aer284 (*Aeromonas hydrophila*), Aer337 (*Aeromonas jandaei*), Aer371 (*Aeromonas trota*) foram comparados com os genomas mais representativos disponíveis para cada uma dessas espécies na base de dados do NCBI. Os resultados estão representados na Tabela 10. Todos os isolados tiveram resultados de ANI >95% confirmando novamente os resultados da filogenia e de acordo com os resultados do GGDC–DDH.

Tabela 10 Identidade Média de Nucleotídeos entre cepas controle de *Aeromonas*.

| ISOLADO | ESPÉCIE | CEPA REFERÊNCIA | ANI |
|---------|--------------------------------|-----------------|--------|
| Aer294 | <i>Aeromonas australiensis</i> | CECT 8023 | 96.66% |
| Aer283 | <i>Aeromonas dhakensis</i> | AAK1 | 97.16% |
| Aer284 | <i>Aeromonas hydrophila</i> | ATCC 7966 | 96.74% |
| Aer337 | <i>Aeromonas jandaei</i> | CECT 4228 | 96.50% |
| Aer371 | <i>Aeromonas trola</i> | 4255T | 96.68% |

Fonte: A autora

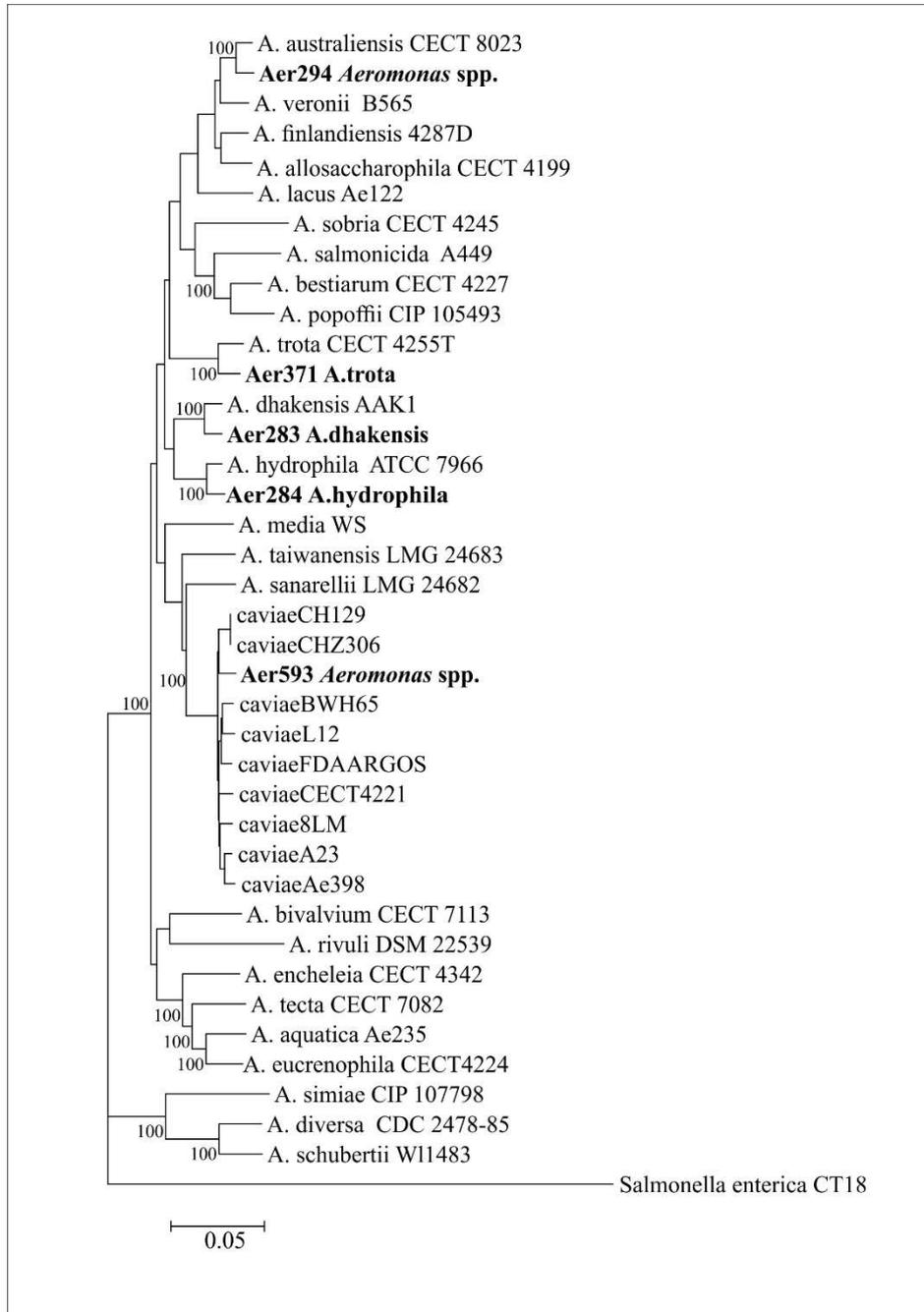
9.5 Multilocus Phylogenetic Analysis (MLPA) – utilizando regiões codificantes completas dos genes *housekeeping*

A fim de confirmar a posição do isolado Aer593 na árvore filogenética regiões codificantes completas para os genes *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* e *dnaX* foram obtidas a partir de genomas de espécies de *Aeromonas* (Anexo B). Para esta análise, foram adicionadas nove cepas de *A. caviae*, visto que essa é a espécie que o isolado Aer593 mais se aproximou na análise filogenética anterior e a espécie com a qual esse isolado foi identificado nas análises de similaridade de genoma.

A árvore gerada a partir das sequências contínuas das regiões codificantes completas dos genes *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* e *dnaX* dos sete isolados de *Aeromonas* e suas relações com outras espécies deste gênero, resultou num alinhamento total de 10.404 pb e a árvore filogenética resultante foi gerada através do método de *neighbor-joining* e pode ser visualizada na Figura 7. Todas as espécies controle desse estudo agruparam com suas respectivas espécies de referência com altos valores de *bootstrap* (>80%) para 1000 replicatas. Por essa metodologia o isolado Aer593, que até então havia formado um ramo monofilético independente, agrupou juntamente com as cepas de *A. caviae*.

Os isolados, controle desse estudo Aer268 (*Aeromonas caviae*) e Aer337 (*Aeromonas jandaei*) não foram incluídos nesta análise porque havia muitos gaps nas sequências dos genes *housekeeping* em estudo, que poderiam afetar o alinhamento resultante.

Figura 7 - Árvore filogenética (*neighbor-joining*) derivada de sequências concatenadas de regiões codificantes completas dos genes *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* e *dnaX*.



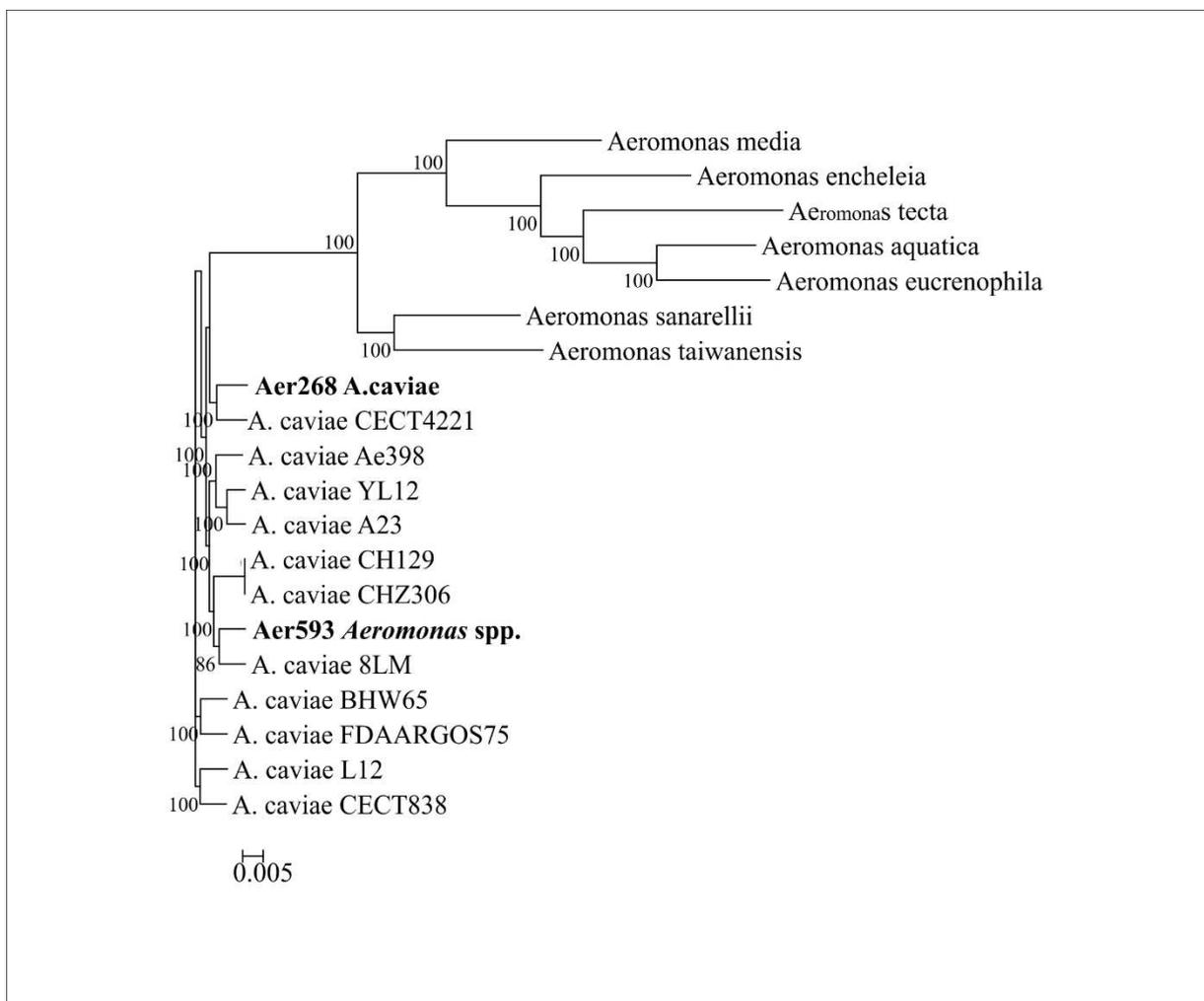
Fonte: A autora

Nota: Relação de cinco isolados de *Aeromonas* em estudo (negrito) e 25 cepas de referência de espécies do gênero. Grupo externo representado pelo gênero *Salmonella*. Números próximos aos nós indicam os valores de *bootstrap* (porcentagem de 1000 replicatas).

9.6 Análise filogenética baseada no *core* genoma

Como prova adicional da relação do isolado Aer593 com as demais cepas de *A. caviae* foi feita a inferência filogenética baseada no *core* genoma com 12 cepas de *Aeromonas caviae*, incluindo o isolado Aer268 (*A. caviae*), controle desse estudo, e outras sete espécies evolutivamente próximas de *A. caviae* (*A. media*, *A. eucrenophila*, *A. aquatica*, *A. sanarellii*, *A. taiwanensis*, *A. encheleia* e *A. tecta*). O *core* genoma entre esses isolados resultou num total de 863 genes que foram alinhados e a árvore pode ser visualizada na Figura 8.

Figura 8 - Árvore filogenética a partir do *core* genoma. Relação do isolado Aer593 com cepas de *Aeromonas caviae* e outras sete espécies de *Aeromonas* intimamente relacionadas.



Fonte: A autora

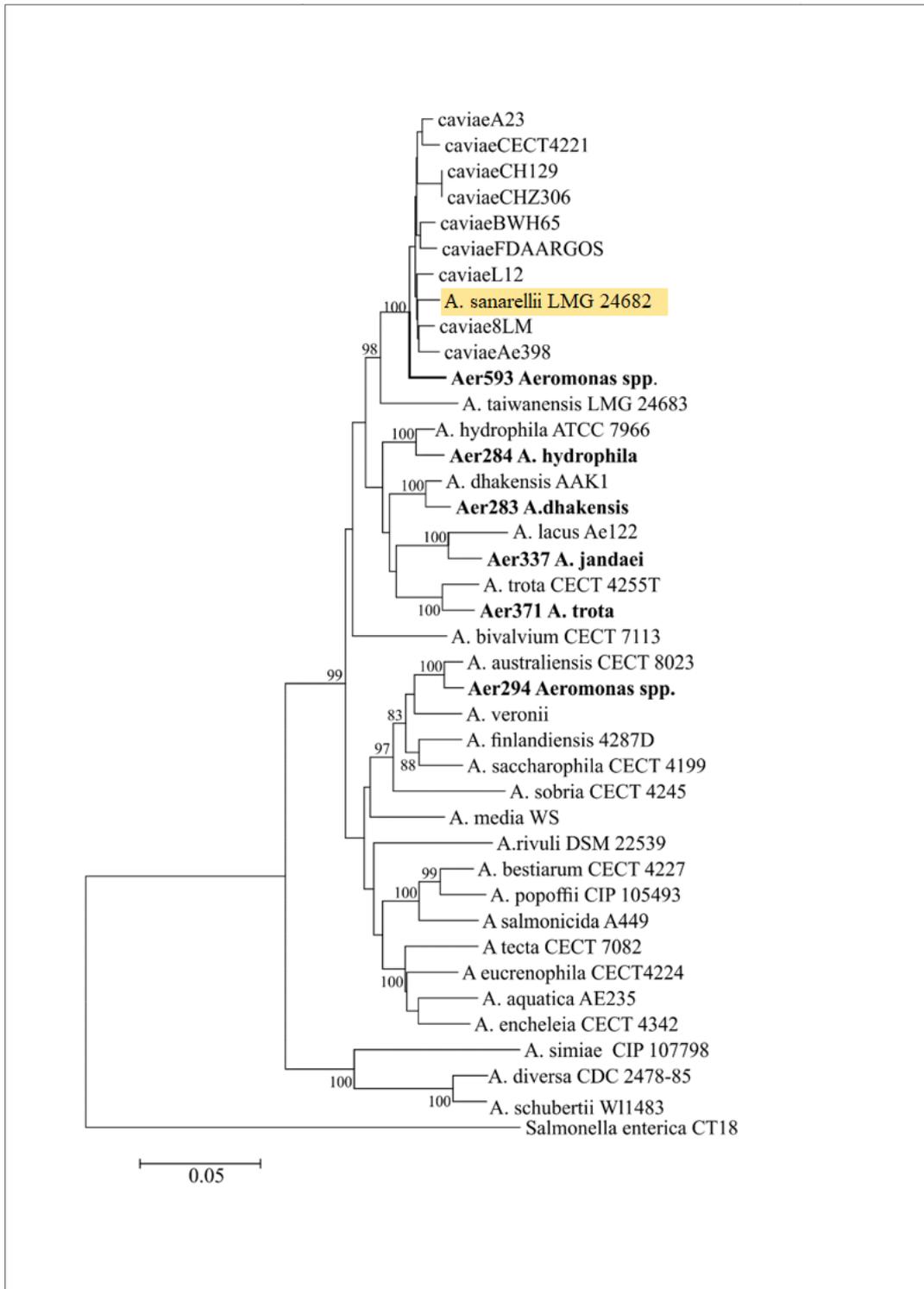
Nota: Relação do isolado Aer593 e 12 cepas de *Aeromonas caviae* e sete espécies de *Aeromonas*. Números próximos aos nós indicam os valores de *bootstrap* (porcentagem de 1000 replicatas).

9.7 Análise do gene *gyrB* como marcador individual

A fim de avaliar a estabilidade do gene *gyrB* como marcador evolutivo para o gênero *Aeromonas*, uma árvore filogenética foi gerada pelo método de *neighbor-joining* construída a partir do alinhamento de 2432 pb do gene *gyrB* e está apresentada na Figura 9.

De uma forma geral, as espécies controle agruparam com as respectivas espécies de referência. Entretanto, a espécie *Aeromonas sanarellii* agrupou com as cepas de *Aeromonas caviae* e o isolado Aer593, formou um ramo monofilético independente. Traduzindo a sequência de nucleotídeos em sequências de aminoácidos, o mesmo resultado foi observado (dados não mostrados).

Figura 9 – Árvore filogenética (*neighbor-joining*) a partir da CDS completa (2432 pb) do gene *gyrB*.



Fonte: A autora

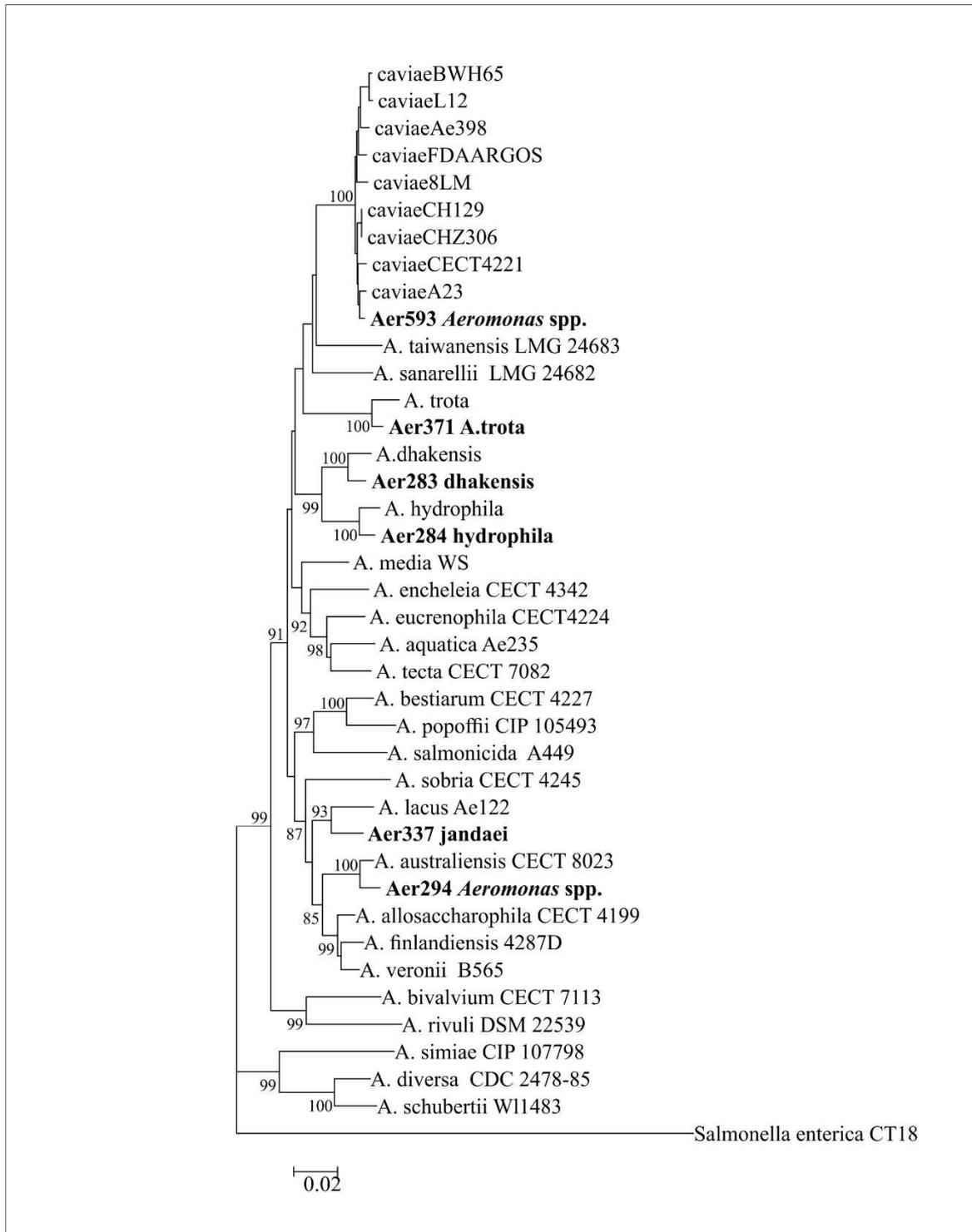
Nota: Relação de seis isolados de *Aeromonas* em estudo e 25 cepas de referência de espécies do gênero. Em destaque *A. sanarellii* agrupada com as cepas de *A. caviae*. Grupo externo representado pelo gênero *Salmonella*. Números próximos aos nós indicam os valores de *bootstrap* (porcentagem de 1000 replicatas).

9.8 Análise do gene *rpoD* como marcador individual

A mesma análise foi feita com o gene *rpoD* para avaliar o poder desse gene como marcador evolutivo para o gênero *Aeromonas*. A árvore filogenética gerada a partir do alinhamento de 1815 pb do gene *rpoD* é apresentada na Figura 10.

É possível observar que todas as espécies controle agruparam com as respectivas espécies referência. A espécie *Aeromonas sanarellii* que havia agrupado com as cepas de *Aeromonas caviae* na análise pelo gene *gyrB*, formou um ramo monofilético independente do ramo de *A. caviae*. Além disso, a árvore obtida somente com o gene *rpoD* foi semelhante à obtida com os seis genes *housekeeping*. Traduzindo a sequência de nucleotídeos em sequências de aminoácidos, o mesmo resultado foi observado (dados não mostrados).

Figura 10 – Árvore filogenética (*neighbor-joining*) a partir da CDS completa (1815 pb) do gene *rpoD*.



Fonte: A autora

Nota: Relação de seis isolados de *Aeromonas* em estudo e 25 cepas de referência de espécies do gênero. Grupo externo representado pelo gênero *Salmonella*. Números próximos aos nós indicam os valores de *bootstrap* (porcentagem de 1000 replicatas).

9.9 Caracterização bioquímica dos isolados

O resultado dos testes bioquímicos utilizando os kits de identificação comercial API® 20E (*BioMérieux*) podem ser visualizados na Tabela 11 e do API 20NE (*BioMérieux*) na Tabela 12.

Tabela 11 Resultado dos testes bioquímicos API 20E.

| API 20E | <i>A. caviae</i> ATCC 15468 | Aer 593 | <i>A. caviae</i> 268 | <i>A. caviae</i> 350 | Aer. 294 |
|------------------|--------------------------------|---------|-------------------------|-------------------------|----------|
| ONPG | + | + | + | + | + |
| ADH | - | + | - | - | + |
| LDC | - | - | - | - | - |
| ODC | - | - | - | - | - |
| CIT | - | - | - | - | - |
| H ₂ S | - | - | - | - | - |
| URE | - | - | - | - | - |
| GEL | - | + | - | - | - |
| GLU | + | + | + | + | + |
| MAN | + | + | + | + | - |
| INO | - | - | - | - | - |
| SOR | - | - | - | - | - |
| RHA | - | - | - | - | - |
| SAC | + | + | + | + | + |
| MEL | - | - | - | - | - |
| AMY | - | - | - | - | + |
| ARA | + | + | + | + | - |
| OX | + | + | + | + | + |

Fonte: A autora

Legenda: ONPG- β-Galactosidase; ADH- arginina dehidrolase; LDC- lisina descarboxilase; ODC- ornitina descarboxilase, CIT- utilização de citrato, H₂S- produção de sulfeto de hidrogênio; URE- urease, GEL- gelatinase. Testes de fermentação/oxidação: GLU- glicose; MAN- manitol; INO- inositol; SOR- sorbitol; RHA- ramnose; SAC- sucrose; MEL- melibiose; AMY- amidalina; ARA- arabinose, OX- oxidase.

Tabela 12 Resultado testes bioquímicos API 20NE.

| API 20NE | <i>A. caviae</i> ATCC 15468 | Aer 593 | <i>A. caviae</i> 268 | <i>A. caviae</i> 350 | (continua) Aer 294 |
|-----------------|--------------------------------|---------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| NO ₃ | + | + | + | + | + |
| TRP | + | + | + | + | |
| GLU | + | + | + | + | + |
| ADH | - | + | - | - | + |
| URE | - | - | - | - | - |
| ESC | + | + | + | + | - |
| GEL | + | + | + | + | - |
| PNPG | + | + | + | + | + |

Tabela 12 Resultado testes bioquímicos API 20NE.

| API 20NE | (conclusão) | | | | |
|----------|--------------------------------|---------|-------------------------|-------------------------|---------|
| | <i>A. caviae</i> ATCC 15468 | Aer 593 | <i>A. caviae</i> 268 | <i>A. caviae</i> 350 | Aer 294 |
| GLU | - + | - + | + | + | - + |
| ARA | + | + | + | + | - |
| MAN | - + | + | + | - + | - |
| MNE | - | - | - | - | + |
| NAG | - + | - + | + | - + | - + |
| MAL | + | + | + | + | + |
| GNT | + | + | - + | + | + |
| CAP | - | + | - + | - | - |
| ADI | - | - | - | - | - |
| MLT | + | + | + | - | + |
| CIT | - | - + | - + | - | - |
| PAC | - | - | + | - | - |
| OX | + | + | + | + | + |

Fonte: A autora

Legenda: + = Reações fracamente positivas. NO₃- redução de nitrato a nitrito; TRP-indol; GLU- glicose; ADH- arginina desidrolase; URE- urease; ESC- esculina; GEL- gelatinase; PNPG- β-galactosidase. Testes de assimilação: GLU- glicose; ARA- arabinose; MAN- manitol; MNE- manose; NAG- n-acetil glucosamina; MAL- maltose; GNT- gluconato de potássio; CAP- ácido cáprico; ADI- ácido adípico; MLT- malato; CIT- citrato; PAC- ácido fenilacético. OX- oxidase.

9.10 Genes de resistência a antimicrobianos encontrados nos genomas dos isolados de *Aeromonas* spp.

Os genes de resistência encontrados nos genomas dos isolados em estudo, com as respectivas identidades podem ser visualizados na tabela 13.

Tabela 13 Genes de resistência a antimicrobianos encontrados nos genomas em estudo.

| ISOLADO | ESPÉCIE | Genes de Resistência | Identidade (%) |
|---------|-----------------------------|--|-------------------------------|
| Aer294 | <i>Aeromonas</i> spp. | blaOXA-12 | 93,81 |
| Aer593 | <i>Aeromonas</i> spp. | blaOXA-504; blaMOX-6 | 99,75; 97,83 |
| Aer268 | <i>Aeromonas caviae</i> | blaMOX-6; blaOXA-504 | 97,92; 99,87 |
| Aer283 | <i>Aeromonas dhakensis</i> | ampH; blaKPC-9; cphA2; blaMOX-6 | 97,47; 98,36; 94,90; 81,77 |
| Aer284 | <i>Aeromonas hydrophila</i> | ampH; cphA1; blaTRU | 98,57; 95,69; 78,41 |
| Aer337 | <i>Aeromonas jandaei</i> | blaOXA-12; cphA1; blaMOX-6; mcr-3.5 | 97,48; 93,15; 84,41; 98,64 |
| Aer371 | <i>Aeromonas trota</i> | blaTRU | 97,48 |

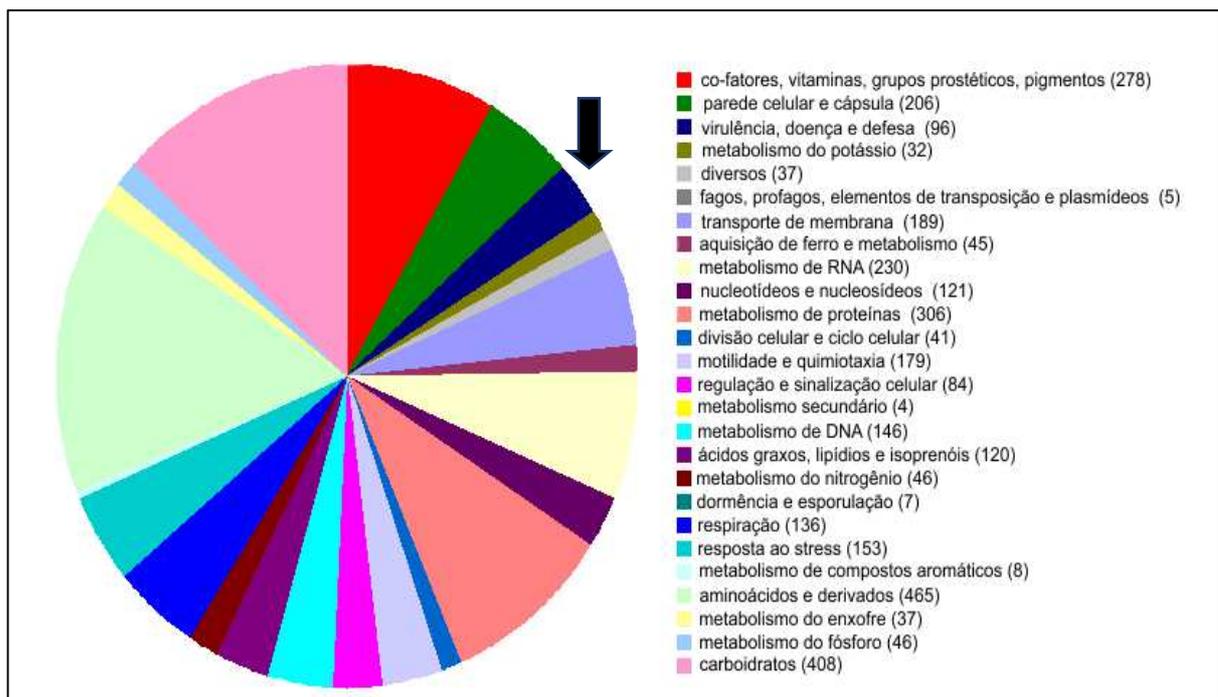
Fonte: A autora

9.11. Presença de genes de virulência nos genomas em estudo

A presença de genes de virulência foi avaliada através da anotação automática pelo RAST *server*. Na Figura 11 encontra-se uma representação do genoma do isolado Aer294, onde é possível visualizar (seta) a parte referente a genes relacionados com a virulência nesses isolados, tendo sido encontrados um total de 96 genes. Para o isolado Aer593 foram encontrados 91 genes, para o Aer268 – *A. caviae* 104 genes, para o Aer283 – *A. dhakensis* 96 genes, para Aer284 – *A. hydrophila* 95 genes, para o Aer337 – *A. jandaei* 89 genes e para o Aer371 *A. trota* 90 genes.

Em geral os genes encontrados estão relacionados a motilidade e quimiotaxia, resposta ao stress, sistemas de secreção e produção de toxinas.

Figura 11 – Representação do genoma do isolado Aer294 predito pelo RAST *server*.



Fonte: A autora

Nota: Seta aponta a porção representativa do genoma que contém genes relacionados à virulência no isolado Aer294.

10 DISCUSSÃO

A taxonomia do gênero *Aeromonas* é reconhecidamente complexa. Desde quando o gênero foi proposto, passou por diversas reclassificações e por isso identificá-las em nível de espécie é um problema que microbiologistas clínicos encontram. Por exemplo, a espécie *Aeromonas culicicola* (PIDIYAR et al., 2002) foi descrita inicialmente por hibridização DNA-DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA; posteriormente outros grupos de pesquisa independentes fizeram inferências de relação de parentesco dessa espécie dentro do gênero *Aeromonas* e foi visto por diferentes metodologias como sequenciamento de genes *housekeeping* e por testes bioquímicos que *A. culicicola* e *A. veronii* eram semelhantes e deveriam ser sinonimizadas apenas como *A. veronii* (HUYS; CNOCKAERT; SWINGS, 2005). O mesmo aconteceu com a espécie *Aeromonas ichthiosmia* que foi inicialmente descrita pela sequência do gene 16S rRNA e pela técnica AFLP e após análises fenotípicas e de hibridização DNA-DNA foi visto que essa espécie também deveria ser sinonimizada como *A. veronii* (HUYS; KÄMPFER; SWINGS, 2001).

Outros exemplos de espécies que foram sinonimizadas foram *Aeromonas enteropelogenes* e *Aeromonas trola*, que após diversos testes bioquímicos e de experimentos de hibridização DNA-DNA não mostraram quaisquer diferenças entre as espécies (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005). Além desses exemplos, a espécie *Aeromonas sharmana* descrita com base apenas no gene 16S rRNA foi removida do gênero *Aeromonas* após estudos filogenéticos utilizando o gene *gyrB* e *rpoD* e de apresentar diversas características bioquímicas atípicas para o gênero (SAAVEDRA; FIGUERAS; MARTÍNEZ-MURCIA, 2006).

Esses problemas de reclassificação devem-se em grande parte à falta de um padrão definido de quais são as etapas necessárias para descrição de novas espécies deste e de outros gêneros bacterianos. Apesar desses problemas terem sido discutidos pelo subcomitê de Taxonomia de Vibrionaceae, nenhum padrão para descrição de novas espécies foi publicado (NAIR; HOLMES, 2005).

Em um estudo de Silva (2015) realizado no departamento de microbiologia do IAM foram utilizados 119 isolados de *Aeromonas* spp. pertencentes ao acervo biológico do instituto em uma análise filogenética utilizando sequências dos genes 16S rRNA e *gyrB*. Cepas de referência *A. hydrophila* ATCC 7966T, *A. veronii* ATCC 35624T e *A. caviae* ATCC

15468T foram usadas como controle. As sequências de nucleotídeos dos genes 16S rRNA e *gyrB* foram alinhadas separadamente e concatenadas (2374 pb) e foi construída uma árvore filogenética destes isolados de *Aeromonas* spp, considerando um valor de *cut off* de 97% de identidade para considerar os isolados pertencentes a uma mesma espécie, com base nas sequências do gene *gyrB* (YANEZ et al., 2003). Para o gene 16S rRNA não existe um valor de *cut off* estabelecido para identificação de espécies de *Aeromonas*. Destes 119 isolados, 79 (66,4%) agruparam com a espécie *A. caviae*; 17 (14,2%) com *A. veronii*; 11 (9,2%) com *A. aquariorum*; 4 (3,4%) com *A. trota*; 4 (3,4%) com *A. hydrophila* e 2 (1,7%) com *A. jandaei*. Todas as espécies se posicionaram em ramos independentes na árvore. Entretanto, dois isolados (Aer294 e o Aer593) não agruparam com nenhuma das espécies do gênero, indicando que esses isolados eram diferentes das espécies de *Aeromonas* relatadas até aquele momento.

Diante da possibilidade de descrição de duas possíveis novas espécies e da necessidade de identificação desses isolados, foram obtidos os genomas desses isolados juntamente com o de outras cinco espécies de *Aeromonas* spp. do acervo biológico do IAM.

Foi possível perceber que mesmo para os genes *gyrB* e *rpoD* a taxa de substituição nucleotídica é baixa, resultando em alta identidade, mesmo entre espécies diferentes, confirmando dados da literatura que somente através de análise filogenética utilizando genes *housekeeping* concatenados é possível realizar a classificação taxonômica de *Aeromonas* spp.

A fim de esclarecer a posição taxonômica desses dois isolados, inicialmente foram utilizadas sequências parciais concatenadas de seis genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* e *dnaX*) para gerar a árvore filogenética. Essa metodologia vem sendo utilizada tanto para inferência evolutiva do gênero (LÓREN; FARFÁN, FUSTÉ, 2014) quanto na descrição das espécies mais recentemente publicadas para o gênero *Aeromonas* (FIGUERAS et al., 2017).

Neste estudo foi visto que, por essa metodologia, a topologia da árvore filogenética gerada ficou coerente com as últimas árvores de *Aeromonas* apresentadas na literatura, inclusive as espécies utilizadas como controle agruparam com as suas respectivas espécies de referência com altos valores de *bootstrap*, ou seja, as relações entre as espécies deste gênero, foram consistentes com as últimas árvores filogenéticas publicadas para o gênero *Aeromonas* (FIGUERAS et al., 2017; MARTINEZ-MURCIA et al., 2016).

O isolado Aer593, que estava identificado somente como *Aeromonas* spp., formou um ramo monofilético independente, sendo o resultado da técnica MLPA com sequência de genes *housekeeping* parciais, consistente com os resultados apresentados pelo estudo de Silva (2015) utilizando somente as sequências dos genes 16S rRNA e *gyrB*. Sendo essa, mais uma evidência de que o isolado Aer593 se tratava de uma nova espécie do gênero.

O outro isolado que havia formado um ramo monofilético independente no estudo de Silva (2015) (Aer294), sugerindo que esse isolado se tratava de uma nova espécie do gênero, após a análise de MLPA agrupou com a espécie *Aeromonas australiensis*, isolada de um sistema irrigação na Austrália. Inicialmente, uma análise do gene *gyrB* e *rpoD* sugeriram que esse isolado se tratava de uma nova espécie do gênero. Após uma análise das sequências concatenadas dos genes *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* e *dnaX* essa hipótese foi confirmada e reafirmada após experimentos de hibridização DNA-DNA e também por testes fenotípicos onde a incapacidade de produção de ácido a partir do D-manitol foi um importante marcador para essa espécie (ARAVENA-ROMÁN et al., 2013).

A espécie *A. australiensis* não foi incluída no estudo de Silva (2015) pois não havia sequências dos genes 16S e *gyrB* disponíveis na base de dados do NCBI na época do estudo. O isolado Aer294 foi obtido a partir de uma coprocultura de um paciente durante o surto de diarreia em São Bento do Una em 2004. Não existem outros relatos de isolamento de *A. australiensis* em isolados clínicos na literatura e este é um importante achado, visto que mostra que essa espécie não está restrita geograficamente ao local de onde foi isolada, sendo ubíqua ao meio ambiente como outras espécies do gênero, bem como também mostra o potencial patogênico ao homem, uma vez que foi isolada de um paciente com gastroenterite. Recentemente essa espécie também foi identificada como parte da microbiota do filé da carpa-cabeçuda (*Aristichthys nobilis*), através da identidade pela sequência do gene 16S rRNA com identidade de 99,5% para esse gene (LIU et al., 2016).

Comparando o resultado do MLPA com os resultados do MALDI-TOF-MS realizado é possível perceber que apesar de a maioria das espécies terem resultados concordantes entre o MALDI-TOF-MS e a análise filogenética, para os isolados Aer294 e Aer283 essa técnica não identificou corretamente esses isolados em nível de espécie. O isolado Aer294 foi identificado por MLPA como *A. australiensis* e por MALDI-TOF-MS como *A. veronii*. Embora o *score* tenha resultado >2,00 isso não garante a identificação pois, conforme relatado por Vávrová et al. (2015) para espécies novas ou recentemente descritas o MALDI-TOF-MS pode levar a grande número de *scores* falso-positivos e, portanto, a conclusões equivocadas de

identificação de alguns isolados. Vávrová et al. (2015) também destaca que algumas espécies patogênicas oportunistas como *A. dhakensis*, *A. taiwanensis* e *A. sanarellii* podem acabar sendo identificadas como outras espécies de *Aeromonas* sem relevância clínica. Outro ponto destacado é que uma vez que a base de dados do Biotyper aumentou o número de novas cepas de *Aeromonas*, o número de espécies identificadas incorretamente aumentou 28%, mostrando que para o gênero *Aeromonas*, aumentar a base de dados não significa um aumento proporcional no número de identificações corretas.

O isolado Aer283 foi identificado por análise filogenética como *Aeromonas dhakensis* e por MALDI-TOF-MS como *Aeromonas media*, porém, com um score < 2,00 que indica confiabilidade apenas sobre o gênero do isolado. O isolado Aer593, que não agrupou com nenhuma das espécies na análise filogenética, por MALDI-TOF foi identificado como *Aeromonas caviae*, com um score >2,00, sendo *A. caviae* a espécie que esse isolado mais se aproximou na árvore filogenética.

Juntos esses resultados corroboram a análise de Shin et al. (2015) que comparou métodos moleculares de identificação utilizando os genes 16S rRNA, *gyrB* e *rpoD* e a técnica de MALDI-TOF e viu que a identificação por MALDI-TOF para os isolados testados só foi correta em 92,3%, não sendo, portanto, suficiente para identificar *Aeromonas* em nível de espécie, sendo a análise filogenética com genes *housekeeping* essencial para esse propósito, confirmando o observado por Vávrová et al. (2015).

Os isolados em estudo também foram submetidos à comparação genômica por GGDC-DDH e ANI como complemento para identificação. A hibridização DNA-DNA, tradicionalmente utilizada por taxonomistas como padrão-ouro para identificação de novas espécies e para comparação de distâncias genéticas entre microrganismos, vem sendo substituída por novos métodos de comparações genômicas como a hibridização *in silico* GGD e pelo ANI, tanto por mostrarem correlações com a hibridização DNA-DNA tradicional como por apresentar baixos índices de erro (AUCH et al., 2010; KIM et al., 2014). Além disso a hibridização DNA-DNA é uma técnica laboriosa, de difícil reprodução e propensa a erros (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001). Tortoli (2017) utilizando o gênero *Mycobacterium* como exemplo, afirma que o genoma completo deve ser um requisito primário para descrição de novas espécies bacterianas e que o GGD e o ANI devem ser calculados com as espécies mais intimamente relacionadas, pois esses métodos evitam que duas espécies similares sejam descritas como diferentes e, além disso, a caracterização genômica evita a necessidade de uma detalhada caracterização fenotípica.

Esses métodos já vêm sendo utilizados como suporte aos resultados das análises filogenéticas com genes *housekeeping* na descrição de novas espécies do gênero *Aeromonas*, como na descrição das espécies *Aeromonas aquatica*, *Aeromonas finlandiensis* e *Aeromonas lacus* (BEAZ-HIDALGO et al., 2015) e recentemente para as espécies *Aeromonas intestinalis*, *Aeromonas entérica*, *Aeromonas crassostreae* e *Aeromonas aquatilis* (FIGUERAS et al., 2017).

Portanto, esses métodos deram suporte para confirmar que o isolado Aer294 se tratava de *A. australiensis* uma vez que apresentou resultado 71,5% no GGDC e 96,66% no ANI quando comparado com a cepa CECT8023 de *A. australiensis*. Da mesma forma, a análise indica que o isolado Aer593 não se trata de uma nova espécie como sugerido pelas análises filogenéticas tanto dos genes 16S-*gyrB* (SILVA, 2015) quanto do MLPA utilizando sequências parciais dos seis genes *housekeeping*, e sim, que é uma cepa de *A. caviae*. Da mesma forma, a análise do ANI evidenciou que o isolado Aer593 pertence à espécie *A. caviae*.

Tendo em vista que na análise filogenética por MLPA utilizando sequências parciais de seis genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* e *dnaX*) o isolado Aer593 formou um ramo monofilético independente, foram realizadas duas análises adicionais para confirmar a posição desse isolado em relação às outras espécies do gênero: 1) utilizando as sequências completas a partir dos genomas dos mesmos seis genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* e *dnaX*); 2) fazendo uma análise filogenética a partir do *core* genoma. Para estas análises, foram incluídas nove cepas de *A. caviae* e, em ambas as análises, o isolado Aer593 agrupou com as demais cepas de *A. caviae* confirmando a posição taxonômica deste isolado.

Em relação aos genes *gyrB* e *rpoD* sendo utilizados como marcadores individuais para inferir relações entre as espécies do gênero *Aeromonas*, o gene *gyrB* não conseguiu separar a espécie *A. sanarelli* das demais espécies de *A. caviae*, não devendo, portanto, ser usado como marcador taxonômico, diferentemente do que foi proposto por Yanez et al., 2003. O gene *rpoD* se mostrou um bom marcador taxonômico individual para identificação das espécies do gênero. Figueras e Beaz-Hidalgo (2015) já haviam relatado o bom poder de resolução do *rpoD*, e nas últimas espécies descritas para o gênero, inicialmente foi feita uma árvore apenas utilizando este gene, onde quatro cepas formaram ramos independente das demais espécies do gênero e estas foram confirmadas como novas espécies após realização de MLPA com os genes *rpoD*, *gyrB*, *gyrA*, *recA*, *dnaJ* e *dnaX* e *isDDH* (FIGUERAS et al., 2017).

Embora muito utilizada na literatura, a técnica de MLPA a partir de sequências parciais dos genes *housekeeping* de *Aeromonas* pode levar a conclusões equivocadas sobre a posição de determinados isolados. O presente trabalho descreve uma metodologia robusta e confiável para classificar taxonomicamente isolados de *Aeromonas*, através de MLPA com sequências completas de genes *housekeeping* ou através da análise filogenética pelo core genoma, ambos aliados à análise de isDDH e ANI. Podendo, assim, identificar e classificar as espécies de *Aeromonas spp.* de forma mais criteriosa, evitando as reclassificações que ocorrem dentro desse gênero bacteriano frequentemente.

Em geral, todos os testes bioquímicos realizados estão de acordo com o que foi esperado para cada uma das espécies testadas, incluindo o isolado Aer593, que teve resultados bioquímicos compatíveis com as espécies de *A. caviae*.

Em relação aos genes de resistência encontrados, todos estão relacionados com a resistência a antimicrobianos beta-lactâmicos, sendo a resistência a essa classe de antibióticos a mais problemática para o gênero (JANDA; ABBOTT, 2010).

Um fato interessante foi encontrar o gene *blaKPC-9* no isolado de *A. dhakensis* (Aer283), porque este isolado foi obtido quatro anos antes do primeiro relato de *blaKPC* no Brasil (MONTEIRO et al., 2009). No entanto, são necessários experimentos de confirmação sobre a identidade do mesmo, bem como testes fenotípicos.

Conforme já havia sido apontado por Silva et al. (2017) muitos genes relacionados a virulência foram encontrados, reforçando o potencial virulento dessas bactérias e a necessidade de controle de contaminação por essas bactérias, principalmente no abastecimento de água.

11 CONCLUSÕES

- a) O MALDI-TOF MS só é um método confiável para a identificação de isolados de *Aeromonas* em nível de gênero;
- b) As análises filogenéticas mostraram que os dois isolados não eram duas novas espécies do gênero *Aeromonas* e sim cepas de espécies já descritas;
- c) Os resultados desse estudo mostraram que o gene *gyrB* não deve ser usado como marcador taxonômico para espécies de *Aeromonas*;
- d) O gene *rpoD* se mostrou um bom marcador taxonômico para espécies de *Aeromonas*;
- e) A melhor forma de descrição novas espécies de *Aeromonas* é através da análise filogenética pelo core genoma aliada a métodos de comparação genômica como isDDH e ANI;
- f) Os isolados de *Aeromonas* em estudo albergam genes de resistência a beta-lactâmicos e possuem potencial virulento, porém, um estudo mais detalhado acerca do papel desses genes na patogenicidade dos isolados é necessário.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, S. L. et al. Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, p. 1103-1104, 1998.
- ABBOTT, S.L., CHEUNG, W.K., JANDA, J.M.. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 41, p. 2348–2357, 2003.
- ALI, A. et al. *Aeromonas bestiarum* sp. nov., (formerly genomospecies DNA group 2 A. *hydrophila*), a new species isolated from non human sources. **Med. Microbiol. Lett.**, Estugarda, v. 5, p. 156-165, 1996.
- ALLEN, D.A. et al. *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Ames, v. 33, p. 599-604, 1983.
- ALPERI, A et al.. Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact inspecies delineation. **Int. Microbiol.**, Barcelona, v. 11, n.3, p. 185-94, 2008.
- ALPERI, A. et al. *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a spanish river. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 60, p. 72-77, 2010a.
- ALPERI, A et al. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., clinical species from Taiwan. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, p. 2048-2055, 2010b.
- ANDREW, S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.** Cambridge, 2010. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>>. Acesso em: 20 set. 2016.
- ARAVENA-ROMÁN, M. et al. *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 63, p. 2270-2276, 2013.
- AUCH, A. F. et al. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. **Stand. Genomic. Sci.**, Londres, v. 2, p. 117–134, 2010.
- AZIZ, R.K. et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, Londres, v. 9, n. 1, p. 75, 2008.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **J.Comput. Biol.**, Nova York, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012.
- 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. **Syst. Appl. Microbiol.**, Estugarda, v. 38, p. 161-168, 2015.
- BEAZ-HIDALGO, R. et al. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. **Syst. Appl. Microbiol.**, Estugarda, v. 32, n.7, p. 471-479, 2009.
- BEAZ-HIDALGO, R.; MARTINEZ-MURCIA, A.; FIGUERAS, M. J. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al., 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martinez-Murcia et al., 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. **Syst. Appl. Microbiol.**, Estugarda, v. 36, n. 3, p. 171-176, 2013.

- BENAGLI, C. et al. A rapid MALDI-TOF MS identification database at genospecies level for clinical and environmental *Aeromonas* strains. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 7, n. 10, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/articleid=10.1371/journal.pone.0048441>>. Acesso em: 20 jan. 2017.
- BRANN, O. S. Infectious complications of cirrhosis. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, Filadélfia, v. 3, p. 285-292, 2001.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.
- CARNAHAN, A.; FANNING, G. R.; JOSEPH, S. W. *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *A. sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 29, p. 560–564, 1991.
- CARVALHO, M. J. et al. Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 159, n. 3, p. 230–239, 2012.
- CARVER, T. et al. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics.**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 464-469, 2012.
- CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Mol. Biol. Evol.**, Chicago, v.17, p. 540-542, 2000.
- CHAN, F.K.L. et al. *Aeromonas* infection in acute suppurative cholangitis: review of 30 cases. **J. Infect.**, Londres, v. 40, p. 69-73, 2000.
- CHEN, P.L. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Can Accurately Differentiate *Aeromonas dhakensis* from *A. hydrophila*, *A. caviae*, and *A. veronii*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 52 n. 7, p. 2625-2628, 2014.
- COLLINS, M.D.; MARTINEZ-MURCIA, A.J.; CAI, J. *Aeromonas enteropelogenes* and *Aeromonas ichthiosmia* are identical to *Aeromonas trota* and *Aeromonas veronii*, respectively, as revealed by small-subunit rRNA sequence analysis. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Ames, v. 43, p. 855-856, 1993.
- COLWELL, R.R.; MACDONELL, M.T.; DE LEY, J. Proposal to recognize the family Aeromonadaceae fam. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 36, p. 473-477, 1986.
- CREMONESINI, D.; THOMSON, A. Lung colonization with *Aeromonas hydrophila* in cystic fibrosis believed to have come from a tropical fish tank. **J. R. Soc. Med**, Londres, v. 101, p. S44-S45, 2008.
- DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nat. Methods**. Nova York, v.9, p.772, 2012.
- DEMARTA, A. et al. *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. **Syst. Appl. Microbiol.**, Estugarda, v.31, p.278-286, 2008.
- ESTEVE, C. et al. *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Ames, v. 45, p. 462-466, 1995.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res.**, Londres, v. 32, p. 1792-1797, 2004.

- FIGUERAS, M. J. et al. “*Aeromonas intestinalis*” and “*Aeromonas enterica*” isolated from human faeces, “*Aeromonas crassostreae*” from oyster and “*Aeromonas aquatilis*” isolated from lake water represent novel species. **New Microbes New Infect.**, Marseille, v. 15, p. 74-76, 2017.
- FIGUERAS, M. J. et al. *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 61, p. 242-248, 2011a.
- FIGUERAS, M. J. et al. Recommendations for a new bacterial species description based on analyses of the unrelated genera *Aeromonas* and *Arcobacter*. **Bull BISMis.**, Athens, v. 2, p. 1-16, 2011b.
- FUKUSHIMA, M.; KAKINUMA, K.; KAWAGUCHI, R. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, p. 2779-2785, 2002.
- GAVÍN, R. et al. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 43, p. 383-397, 2002.
- GHENGHESH, K.S. et al. *Aeromonas*-associated infections in developing countries. **J. Infect. Dev. Ctries.**, Sassari, v. 2, p. 81-98, 2008.
- GORIS, J. et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 57, p. 81-91, 2007.
- GRAM, L. et al. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.65, n.3, p. 969-973, 1999.
- GRIFFIN, P.J. et al. A more comprehensive description of *Bacterium salmonicida*. **Trans. Amrc.Fish. S.**, Nova York, v. 82, p. 129-138, 1953.
- HAN, J. E. et al. First description of the *qnrS*-like (*qnrS5*) gene and analysis of quinolone resistance-determining regions in motile *Aeromonas* spp. from diseased fish and water. **Res. Microbiol.**, Paris, v. 163, n. 1, p. 73-79, 2012a.
- HAN, J. E. et al. First description of ColE-type plasmid in *Aeromonas* spp. carrying quinolone resistance (*qnrS2*) gene. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 290-294, 2012b.
- HARF-MONTEIL, C. et al. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 54, p. 481-485, 2004.
- HICKMAN-BRENNER, F.W. et al. *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 26, p. 1561-1564, 1988.
- HICKMAN-BRENNER, F.W. et al. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 25, p. 900-906, 1987.
- HOFER E, et al. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 39, p. 217- 220, 2006.

- HU, M. et al. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 55, p. 224-233, 2012.
- HUYS, G. et al. *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Ames, v. 47, p. 1165-1171, 1997.
- HUYS, G.; KAMPFER, P.; SWINGS, J. New DNA-DNA hybridization and phenotypic data on the species *Aeromonas ichthiosmia* and *Aeromonas allosaccharophila*: *A. ichthiosmia* Schubert et al. 1990 is a later synonym of *A. veronii* Hickman-Brenner et al. 1987. **Syst. Appl. Microbiol.**, Estugarda, v. 24, p. 177-182, 2001.
- HUYS, G. et al. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov., isolated from children with diarrhoea in Bangladesh, and extended description of *Aeromonas hydrophila* subs *hydrophila* (Chester 1901) Stainer 1943. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 52, p. 705-712, 2002a.
- HUYS, G.; DENYS, R.; SWINGS, J. DNA-DNA reassociation and phenotypic data indicate synonymy between *Aeromonas enteropelogenes* Schubert et al. 1990 and *Aeromonas trota* Carnahan et al. 1991. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading. v., 52, p.1969-1972, 2002b.
- HUYS, G.; CNOCKAERT, M.; SWINGS, J. *Aeromonas culicicola* Pidiyar et al. 2002 is a later subjective synonym of *Aeromonas veronii* Hickman-Brenner et al. 1987. **Syst. Appl. Microbiol.**, Estugarda, v. 28, p. 604-609, 2005.
- HIRANSUTHIKUL, N. et al. Skin and soft-tissue infections among tsunami survivors in southern Thailand. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 41, p. 93-96, 2005.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. *Aeromonas* in microorganisms in foods 5. In: **Microbiological characteristics of food pathogens**. Londres: Kluwer: Plenum Publishers, 1996.
- IGBINOSA, I.H. et al. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. **ScientificWorldJournal**, Cairo, p. 1-13, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3373137/>> Acesso em: 15 set. 2017.
- JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 23, p. 35-73, 2010.
- JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 45, n. 9, p. 2761-2764, 2007.
- JOSEPH, S.W.; CARNAHAN, A.M. Update on the genus *Aeromonas*. **ASM News**, Washington, v. 66, p. 218-223. 2000.
- KHAN, M. I.; WALTERS, G.; METCALFE, T. Bilateral endogenous endophthalmitis caused by *Aeromonas hydrophila*. **Eye**, Londres, v. 21, p. 1244-1245, 2007.
- KIM, M. et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v.64, p. 346-351, 2014.

- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.**, Nova York, v.16, p.111-120, 1980.
- KUIJPER, E. J. et al. Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 27, n. 1, p. 132-138, 1989.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol. Biol. Evol.**, Chicago, v.33, p. 1870-1874, 2016.
- KÜPFER, M. et al. Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 56, n. 12, p. 2743-2751, 2006.
- LAMY, B. et al. Prospective nationwide study of *Aeromonas* infections in France. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 47, p. 1234-1237, 2009.
- LIBISCH, B. et al. Identification of the first VIM metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 46, n. 5, p. 1878-1880, 2008.
- LIU, X. et al. Characterization of the microbiota in lightly salted bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillets stored at 4 °C. **Food Microbiol.**, Londres, v. 62, p.106-111, 2016.
- LORÉN, J. G.; FARFÁN, M.; FUSTÉ, M. C. Molecular phylogenetics and temporal diversification in the genus *Aeromonas* based on the sequences of five housekeeping genes. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 9, n. 2, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0088805>>. Acesso em: 15 set. 2016
- MARTENS, M. et al. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 58, p. 200-214, 2008.
- MARTINEZ-MURCIA, A. J.; BENLLOCH, S.; COLLINS, M. D. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Ames, v. 42, p. 412-421, 1992a.
- MARTINEZ-MURCIA, A. J. et al. *Aeromonas allosacharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 91, p. 199-206, 1992b.
- MARTINEZ-MURCIA, A.J. et al. Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. **Syst. Appl. Microbiol.**, Estugarda, v. 34, n.3, p.189-199, 2011
- MARTINEZ-MURCIA, A. et al. *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. **Curr. Microbiol.**, Nova York, v. 66, p. 197-204, 2013.
- MARTINEZ-MURCIA, A. et al. *Aeromonas lusitana* Sp. Nov., isolated from untreated water and vegetables. **Curr. Microbiol.**, Nova York, v. 72, n. 6, p. 795-803, 2016.
- MARTI, E.; BALCÁZAR, J.L. *Aeromonas rivipollensis* sp. nov., a novel species isolated from aquatic samples. **J. Basic Microbiol.**, Berlin, v. 55, p. 1435-1439, 2015.

- MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S. W. Aeromonadaceae. In: BRENNER, D. J. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. Nova York: Springer, 2005. v.2, part. B, p.557-578.
- MEIER-KOTLOFF, J.P. et al. Genome sequence based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**, Londres, v. 14, p. 60, 2013.
- MIÑANA-GALBIS, D. et al. *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 57, p. 582-587, 2007.
- MIÑANA-GALBIS, D. et al. Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. **Syst. Appl. Microbiol.**, Estugarda, v. 33, p. 15-19, 2010.
- MIÑANA-GALBIS, D. et al. *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 54, p. 2073-2078, 2004.
- MONTEIRO, J. et. al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.53, p.333-334, 2009
- MUKHOPADHYAY, C. et al. Emerging extra-intestinal infections with *Aeromonas hydrophila* in coastal region of southern Karnataka. **J. Postgrad. Med.**, Mumbai, v. 54, n. 3, p. 199–202, 2008.
- NAIR, G. B.; HOLMES, B. International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of Vibrionaceae; Minutes of the Meetings, 31 July 2002, Paris, France. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 55, p. 539-542, 2005.
- NAM, I.Y.; JOH, K. Rapid detection of virulence of *Aeromonas* isolated from a trout by hexaplex-PCR. **J. Microbiol.**, Seoul, v.45, n.4, p.297-304, 2007.
- NHUNG, P. H. et al. Use of the novel phylogenetic marker *dnaJ* and DNA-DNA hybridization to clarify interrelationships within the genus *Aeromonas*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 57, p. 1232-1237, 2007.
- O'DWYER, J.; DOWLING, A.; ADLEY, C. The impact of climate change on the incidence of infectious waterborne disease. In: Saeid Eslamian. **Urban Water Reuse Handbook**. Flórida: CRC Press, 2016. cap. 77, p. 1017-1026.
- PARK, T. S. et al. Misidentification of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* as *Vibrio alginolyticus* by the Vitek system. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 37, p. 349-353, 2003.
- PARKER J.L.; SHAW J.G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **J. Infect.**, Londres, v. 62, p. 109-118, 2011.
- PATEL, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. **Clin. Chem.**, Nova York, v. 61, n. 1, p. 100-111, 2015.
- PEREIRA, C.S. et al. Characterization of *Aeromonas* spp isolates from newborns hospitalized. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasilia, v. 41, p. 179-182, 2008.
- PIDIYAR, V. et al. *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*, **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v.52, p. 1723–1728, 2002.
- PIOTROWSKA, M.; POPOWSKA, M. The prevalence of antibiotic resistance genes among *Aeromonas* species in aquatic environments. **Ann. Microbiol.**, Milão, v. 64, n. 3, p. 921–934, 2014.

- POPOFF, M. *Aeromonas*. IN: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Org.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p. 545-548.
- POPOFF, M.; VÉRON, M. A. Taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. **J. Gen. Microbiol.**, Londres, v. 94, p. 11-22, 1976.
- PREDIGER, K. D., et al. A prospective study on *Aeromonas* in outpatients with diarrhea in the central region of Rio Grande do Sul State. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 43, p. 966-968, 2012.
- PRESLEY, S. M., et al. Assessment of pathogens and toxicants in New Orleans, LA following hurricane Katrina. **Environ. Sci. Technol.**, Easton, v. 40, p. 468-474, 2006.
- ROGER, F. et al. Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution. **BMC Microbiol.**, Londres, v. 12, p. 62-85, 2012.
- ROSSELLÓ-MORA, R.; RUDOLF, A. The species concept for prokaryotic. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 3, p. 39-67, 2001
- SAAVEDRA, M. J.; FIGUERAS, M. J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 56, p. 2481-2487, 2006.
- SAFFERT, R.T., et al. Comparison of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometer to BD Phoenix Automated Microbiology System for Identification of Gram-Negative Bacilli. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 49, n. 3, p. 887–892, 2011.
- SAITOU, N; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, Chicago, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SCHUMANN, P.; MAIER, T. MALDI-TOF Mass Spectrometry applied to classification and identification of bacteria. In: HARWOOD, C.; JENSEN, G. **Methods in Microbiology: New Approaches to Prokaryotic Systematics**. Londres: Elsevier, 2014. v. 41, p. 275-306.
- SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 14, p. 2068-2069, 2014.
- SENG, P. et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 49, p. 543-551, 2009.
- SEPE, A. et al. Evaluation of *recA* sequencing for the classification of *Aeromonas* strains at the genotype level. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 46, p. 439-444, 2008.
- SESHADRI, R. et al. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 188, p. 8272-8282, 2006.
- SILVA, L. C. A. **Caracterização molecular de isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* spp. obtidos no Estado de Pernambuco**. 2015. 122 f. Tese (Doutorado em Genética) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2015.
- SILVA, L. C. A. Genetic diversity and virulence potential of clinical and environmental *Aeromonas* spp. isolates from a diarrhea outbreak. **BMC Microbiol.**, Londres, v. 17. p. 179, 2017.

- SHIN, H. B. et al. Comparison of maldi-tof ms, housekeeping gene sequencing, and 16s rRNA gene sequencing for identification of *Aeromonas* clinical isolates. **Yonsei Med. J.**, Seoul, v. 56, n. 2, p. 550–555, 2015.
- SCHUBERT, R.H.W.; HEGAZI, M. *Aeromonas eucrenophila* species nov. *Aeromonas caviae* a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. **Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol.**, Estugarda, v. 268, p. 34-39, 1988.
- SCHUBERT, R.H.W.; HEGAZI, M.; WAHLIG, W. *Aeromonas enteropelogenes* species nova. **Hyg. Med.**, Londres, v.15, p. 471–472, 1990.
- STAINER, R.Y. A note on the taxonomy of *P. hydrophilus*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 46, p. 213-214, 1943.
- TEUNIS, P.; FIGUERAS, M.J. Reassessment of the enteropathogenicity of mesophilic *Aeromonas* species. **Front. Microbiol.**, Washington, v. 7, p. 1395, 2016.
- TORTOLI, E. The new bacterial species description: the genus *Mycobacterium* as an example. **Rev. Pan-Amaz. Saude**, Belém, v. 8, n. 4, p. 9–10, 2017.
- VÁVROVÁ, A. et al. Evaluation of the MALDI-TOF MS profiling for identification of newly described *Aeromonas* spp. **Folia Microbiol.**, Praga, v. 60, p. 375, 2015.
- VON GRAEVENITZ, A.; MENSCH, A.H. The genus *aeromonas* in human bacteriology report of 30 cases and review of the literature. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 1, n. 5, p. 245-249, 1968.
- WANG, L.T. et al. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 57, p. 1846-1850, 2007.
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 51, p. 221–271, 1987.
- YÁÑEZ, M.A. et al. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 53, p. 875-883, 2003.
- ZANKARI, E. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **J. Antimicrob. Chemother.**, Londres, v. 67, n. 11, p. 2640-2644, 2012.
- ZERBINO, D. Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. **Curr. Protoc. Bioinformatics**, Cambridgeshire, cap. 11, unid. 11.5, 2010.

**ANEXO A - Genes parciais utilizados na técnica *Multilocus Phylogenetic Analysis*
MLPA disponíveis na base de dados GenBank/NCBI**

(continua)

| <i>Espécie - Aeromonas</i> | Cepa | Nº de acesso <i>gyrB</i> | Nº de acesso <i>rpoD</i> | Nº de acesso <i>recA</i> | Nº de acesso <i>dnaJ</i> | Nº de acesso <i>gyrA</i> | Nº de acesso <i>dnaX</i> |
|-----------------------------|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>A. hydrophila</i> | CECT 839 | HQ442746 | HQ442791 | HQ442926 | HQ443048 | HQ443174 | HQ442472 |
| <i>A. salmonicida</i> | CECT 894 | HQ442680 | HQ442843 | HQ442955 | HQ442979 | HQ443089 | HQ442441 |
| <i>A. sobria</i> | CECT 4245 | HQ442698 | HQ442867 | HQ442940 | HQ443076 | HQ443148 | HQ442447 |
| <i>A. media</i> | CECT 4232 | HQ442709 | HQ442785 | HQ442972 | HQ443012 | HQ443134 | HQ442507 |
| <i>A. veronii</i> | CECT 4257 | HQ442728 | HQ442833 | HQ442970 | HQ443060 | HQ443160 | HQ442469 |
| <i>A. caviae</i> | CECT 838 | HQ442748 | HQ442790 | HQ442921 | HQ443008 | HQ443146 | HQ442422 |
| <i>A. schubertii</i> | CECT 4240 | HQ442755 | HQ442809 | HQ442876 | HQ443088 | HQ443198 | HQ442533 |
| <i>A. eucrenophila</i> | CECT 4224 | HQ442657 | HQ442770 | HQ442892 | HQ443015 | HQ443115 | HQ442509 |
| <i>A. jandaei</i> | CECT 4228 | HQ442736 | HQ442840 | HQ442915 | HQ443074 | HQ443185 | HQ442455 |
| <i>A. trota</i> | CECT 4255 | HQ442718 | HQ442822 | HQ442933 | HQ443038 | HQ443187 | HQ442490 |
| <i>A. allosaccharophila</i> | CECT 4199 | HQ442733 | HQ442825 | HQ442961 | HQ443058 | HQ443156 | HQ442457 |
| <i>A. encheleia</i> | CECT 4342 | HQ442655 | HQ442778 | HQ442884 | HQ443025 | HQ443139 | HQ442495 |
| <i>A. bestiarum</i> | CECT 4227 | HQ442683 | HQ442854 | HQ442949 | HQ442988 | HQ443097 | HQ442429 |
| <i>A. popoffii</i> | CECT 5176 | HQ442693 | HQ442853 | HQ442941 | HQ442995 | HQ443108 | HQ442437 |
| <i>A. simiae</i> | CIP 107798 | HQ442758 | HQ442811 | HQ442869 | HQ443081 | HQ443191 | HQ442528 |
| <i>A. moluscorum</i> | CECT 5864 | HQ442671 | HQ442812 | HQ442877 | HQ443000 | HQ443110 | HQ442519 |
| <i>A. bivalvium</i> | CECT 7113 | HQ442703 | HQ442817 | HQ442882 | HQ443036 | HQ443141 | HQ442527 |
| <i>A. aquariorum</i> | CECT 7289 | HQ442712 | HQ442798 | HQ442908 | HQ443050 | HQ443166 | HQ442483 |
| <i>A. tecta</i> | CECT 7082 | HQ442662 | HQ442762 | HQ442895 | HQ443020 | HQ443122 | HQ442502 |
| <i>A. piscícola</i> | CECT 7443 | HQ442690 | HQ442859 | HQ442954 | HQ442992 | HQ443100 | HQ442434 |
| <i>A. fluvialis</i> | CECT 7401 | FJ603455 | FJ603453 | FJ603457 | FJ603454 | FJ603456 | HQ442464 |
| <i>A. sanarellii</i> | CECT 7402 | FJ807277 | FJ472929 | FJ472931 | FJ807279 | FJ807276 | HQ442508 |
| <i>A. taiwanensis</i> | CECT 7403 | FJ807272 | FJ472928 | FJ472930 | FJ807270 | FJ807274 | HQ442491 |

**ANEXO A - Genes parciais utilizados na técnica *Multilocus Phylogenetic Analysis*
MLPA disponíveis na base de dados GenBank/NCBI**

(conclusão)

| <i>Espécie - Aeromonas</i> | Cepa | Nº de acesso <i>gyrB</i> | Nº de acesso <i>rpoD</i> | Nº de acesso <i>recA</i> | Nº de acesso <i>dnaJ</i> | Nº de acesso <i>gyrA</i> | Nº de acesso <i>dnaX</i> |
|----------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>A. diversa</i> | CECT 4254T-G501 | HQ442756 | HQ442805 | HQ442872 | HQ443084 | HQ443194 | HQ442534 |
| <i>A. rivuli</i> | DSM 22539 | FJ969434 | FJ969433 | FJ969435 | FJ969432 | FJ969436 | HQ442524 |
| <i>A. cavernicola</i> | MDC 2508 | HQ442702 | HQ442864 | HQ442978 | HQ443080 | HQ443164 | HQ442426 |
| <i>A. australiensis</i> | CECT 8023 | NZ_CDD H01000074 | FN773335 | HE611953 | HE611954 | HE611952 | HE611951 |
| <i>A. aquática</i> | CECT 8025 | HG970927 | HG970949 | HG970938 | HG970894 | HG970916 | HG970905 |
| <i>A. finlandiensis</i> | CECT 8028 | HG970923 | HG970945 | HG970934 | HG970890 | HG970912 | HG970901 |
| <i>A. lacus</i> | CECT 8024 | HG970925 | HG970947 | HG970936 | HG970892 | HG970914 | HG970903 |
| <i>A. rivipollensis</i> | P2G1T | HG799676 | HG799690 | KP003834 | KP003835 | KP003841 | KP003840 |
| <i>A. lusitana</i> | MDC 2473 | HQ442676 | HQ442768 | HQ442903 | HQ443033 | HQ443126 | HQ442515 |
| <i>A. intestinalis</i> | CECT 8980 | LT630717 | LT630710 | LT630731 | LT630738 | LT630724 | LT630745 |
| <i>A. entérica</i> | CECT 8981 | LT630718 | LT630711 | LT630732 | LT630739 | LT630725 | LT630746 |
| <i>A. crassostreae</i> | CECT 8982 | LT630719 | LT630712 | LT630733 | LT630740 | LT630726 | LT630747 |
| <i>A. aquatilis</i> | CECT 8026 | LT630723 | LT630716 | LT630737 | LT630744 | LT630730 | LT630751 |

ANEXO B - Genomas utilizados para as análises do estudo disponíveis *Reference Sequence Database/NCBI*

| Espécie | CEPA | Genoma (Ref.Seq.) |
|-----------------------------|-------------|--------------------------|
| <i>A. hydrophila</i> | ATCC 7966 | NC_008570.1 |
| <i>A. salmonicida</i> | A449 | NC_009348.1 |
| <i>A. sobria</i> | CECT 4245 | NZ_CDBW00000000.1 |
| <i>A. media</i> | WS | NZ_CP007567.1 |
| <i>A. veronii</i> | B565 | NC_015424.1 |
| <i>A. eucrenophila</i> | CECT4224 | NZ_CDDF00000000.1 |
| <i>A. schubertii</i> | WL1483 | NZ_CP013067.1 |
| <i>A. trota</i> | CECT 4255T | NZ_CDDE00000000.1 |
| <i>A. allosaccharophila</i> | CECT 4199 | NZ_CDBR00000000.1 |
| <i>A. encheleia</i> | CECT 4342 | NZ_CDDI00000000.1 |
| <i>A. bestiarum</i> | CECT 4227 | NZ_CDDA00000000.1 |
| <i>A. popoffii</i> | CIP 105493 | NZ_CDBI00000000.1 |
| <i>A. dhakensis</i> | AAK1 | NC_019014.1 |
| <i>A. simiae</i> | CIP 107798 | NZ_CDBY00000000.1 |
| <i>A. bivalvium</i> | CECT 7113 | NZ_CDBT00000000.1 |
| <i>A. tecta</i> | CECT 7082 | NZ_CDCA00000000.1 |
| <i>A. sanarellii</i> | LMG 24682 | NZ_CDBN00000000.1 |
| <i>A. taiwanensis</i> | LMG 24683 | NZ_BAWK00000000.1 |
| <i>A. diversa</i> | CDC 2478-85 | NZ_APVG00000000.1 |
| <i>A. rivuli</i> | DSM 22539 | NZ_CDBJ00000000.1 |
| <i>A. australiensis</i> | CECT 8023 | NZ_CDDH00000000.1 |
| <i>A. aquatica</i> | AE235 | NZ_JRGL00000000.1 |
| <i>A. finlandiensis</i> | 4287D | NZ_JRGK00000000.1 |
| <i>A. lacus</i> | AE122 | NZ_JRGM00000000.1 |
| <i>Salmonella enterica</i> | CT18 | NC_003198.1 |
| <i>A. caviae</i> | CH129 | NZ_MDSD00000000.1 |
| <i>A. caviae</i> | CHZ306 | NZ_MDSC00000000.1 |
| <i>A. caviae</i> | BWH65 | NZ_LESK00000000.1 |
| <i>A. caviae</i> | L12 | NZ_JWJP00000000.1 |
| <i>A. caviae</i> | FDAARGOS | NZ_JTBH00000000.2 |
| <i>A. caviae</i> | CECT4221 | NZ_CDBS00000000.1 |
| <i>A. caviae</i> | 8LM | CP024198.1 |
| <i>A. caviae</i> | A23 | NZ_LFXO00000000.1 |
| <i>A. caviae</i> | Ae398 | NZ_CACP00000000.1 |
| <i>A. caviae</i> | CECT838 | NZ_CDBK00000000.1 |
| <i>A. caviae</i> | YL12 | JOVP01000028.1 |