



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

JOSÉ CARLOS DA ROCHA NETO

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS DETERMINANTES DE
VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE
ISOLADOS DE *AEROMONAS* SPP. ORIUNDOS DE SURTO
DIARREICO.**

Recife
2022

JOSÉ CARLOS DA ROCHA NETO

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS DETERMINANTES DE
VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE
ISOLADOS DE *AEROMONAS* SPP. ORIUNDOS DE SURTO
DIARREICO.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Dr. Danilo Elias Xavier

Co-orientadora: Dra. Nilma Cintra Leal

Recife
2022

JOSÉ CARLOS DA ROCHA NETO

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS DETERMINANTES DE
VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE ISOLADOS DE
AEROMONAS SPP. ORIUNDOS DE SURTO DIARREICO.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Danilo Elias Xavier
Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ/ Departamento de Microbiologia

Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Medicina Tropical

Profa. Dra. Beathriz Godoy Vilela Barbosa
Universidade de Pernambuco/ Instituto de Ciências Biológicas

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Rocha Neto, José Carlos da .

Caracterização genética dos determinantes de virulência e resistência a antimicrobianos de isolados de *Aeromonas* spp. oriundos de surto diarreico / José Carlos da Rocha Neto. - Recife, 2022.

68, tab.

Orientador(a): Danilo Elias Xavier

Coorientador(a): Nilma Cintra Leal

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

1. Genética. 2. Bacteriologia. I. Xavier, Danilo Elias. (Orientação). II. Leal, Nilma Cintra. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

Dedico este trabalho a Sílvia Antunes da Rocha, meu porto seguro, meu sustento, minha bússola, minha inspiração, minha luz, minha avó. Muito obrigado por sempre ter me incentivado a buscar meus sonhos mesmo nos momentos de maior dificuldade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Dr. Danilo Elias Xavier e Dra. Nilma Cintra Leal, pelo conhecimento que me foi passado, pelo incentivo e confiança durante a realização deste trabalho.

Aos membros da banca avaliadora por aceitarem o convite, pelas discussões, sugestões e contribuições que serviram para enriquecer este trabalho.

Aos servidores e colaboradores do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) que foram fundamentais para a preparação dos experimentos deste trabalho

À todos os membros do Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular Aplicada à Microbiologia e Epidemiologia Molecular do IAM, obrigado pelas conversas de bancada e pelas questões levantadas durante as reuniões científicas.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em especial ao Instituto Aggeu Magalhães, por todos os recursos, ferramentas e suporte científico empregado neste trabalho, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

Gostaria de agradecer também a minha família, especialmente a minha avó, Sílvia Antunes, minha mãe, Carla Antunes, e meu irmão João Gabriel, obrigado pelo apoio, incentivo, carinho, compreensão, acolhimento e amor.

Aos amigos, Isa Cordeiro, Maria Eduarda, Cibele Carine, Brenda, Karollyne Skarlet, Marílya Morais, Sabrina Soares e Vitor Lins, obrigado por estarem comigo durante toda a trajetória da graduação e pelas discussões científicas que fortaleceram este trabalho.

ROCHA NETO, José Carlos. **Caracterização genética dos determinantes de virulência e resistência a antimicrobianos de isolados de *Aeromonas* spp. oriundos de surto diarreico**. 2022. 67. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

O gênero *Aeromonas* abriga bacilos Gram-negativos ubíquos do ecossistema aquático e frequentemente isolado de amostras ambientais e alimentícias, atuando como patógeno oportunista. Acredita-se que a ascensão de *Aeromonas* spp. em amostras clínicas esteja ligada ao repertório de virulência e genes de resistência presentes em linhagens específicas. A virulência das espécies de *Aeromonas* é complexa, multifatorial e está relacionada aos componentes estruturais; produção de toxinas e com os sistemas de secreção. O repertório de determinantes de resistência aos antimicrobianos em *Aeromonas* está estabelecido quanto a presença de beta-lactamases, entretanto, a predição de genes *mcr-3* e *mcr-7*, que induzem a resistência às polimixinas, em genomas de *Aeromonas* é um achado importante para o estudo da possível transferência horizontal desses genes entre outros BGNs. Os BGNs podem desenvolver resistência às polimixinas principalmente por meio de mutações cromossômicas em sistemas regulatórios da expressão gênica (*Two-component systems*) que levam a modificações do lipopolissacarídeo (LPS), seu sítio alvo, pela expressão induzível de enzimas 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (Ara4N) e enzima fosfoetanolamina (PEtN) transferase que modificam a porção do lipídio A. A PEtN-transferase denominada MCR, codificadas pelo gene homônimo, é o mecanismo plasmidial de resistência às polimixinas em BGNs. De acordo com a filogenia dos genes *mcr*, as variantes alélicas plasmidiais de MCR-3 e MCR-7 tem sua origem em *Aeromonas* spp. que, possivelmente, servem de reservatório ambiental desses genes. O objetivo deste estudo foi descrever o repertório de fatores de virulência e determinantes de resistências identificados nas cepas estudadas. O repertório de virulência identificados foram comparados com genomas de cepas reconhecidamente virulentas e representativas do gênero *Aeromonas*. Os loci dos genes *mcr* serão descritos e comparados com genomas públicos de *Aeromonas* para comparação de seus contextos genéticos utilizando o PATRICK 3.5.6 e relação filogenética das proteínas será feita pela construção de uma árvore filogenética gerada pelo método PhyML de máxima verossimilhança e visualizadas pelo iTOL. Os resultados revelam a complexidade do repertório de fatores de virulências e a prevalência de genes *mcr-3* e *mcr-7* nos genomas dos isolados de São Bento do Una. A relação fatores de virulência e determinantes de resistência se apresentou inversamente proporcional para os isolados Aer294, Aer284 e Aer337, indicando a possibilidades do seu envolvimento no surto diarreico ocorrido no ano de 2004.

Palavras-chave: *Aeromonas*. Fatores de virulência. Reservatório ambiental. Resistência aos antibióticos. *mcr-3/7*.

ROCHA NETO, José Carlos. **Genetic characterization of virulence and antimicrobial resistance determinants of *Aeromonas* spp. from diarrheal outbreak.** 2022. 67. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

The genus *Aeromonas* harbors ubiquitous Gram-negative bacilli from the aquatic ecosystem and is often isolated from environmental and food samples, acting as an opportunistic pathogen. It is believed that the rise of *Aeromonas* spp. in clinical samples is linked to the virulence repertoire and resistance genes present in specific strains. The virulence of *Aeromonas* species is complex, multifactorial and is related to structural components; toxin production and secretion systems. The repertoire of antimicrobial resistance determinants in *Aeromonas* is established regarding the presence of beta-lactamases, however, the prediction of *mcr-3* and *mcr-7* genes, which induce resistance to polymyxins, in *Aeromonas* genomes is an important finding for the study of the possible horizontal transfer of these genes between other BGNs. BGNs can develop resistance to polymyxins mainly through chromosomal mutations in regulatory systems of gene expression (*Two-component systems*) that lead to modifications of lipopolysaccharide (LPS), its target site, through the inducible expression of 4-amino-4-enzymes. deoxy-L-arabinose (Ara4N) and phosphoethanolamine (PEtN) transferase enzyme that modify the lipid A portion. The PEtN-transferase called MCR, encoded by the homonymous gene, is the plasmid mechanism of resistance to polymyxins in BGNs. According to the phylogeny of the *mcr* genes, the plasmid allelic variants of MCR-3 and MCR-7 originate from *Aeromonas* spp. that possibly serve as an environmental reservoir for these genes. The aim of this study was to describe the repertoire of virulence factors and resistance determinants identified in the studied strains. The identified virulence repertoires were compared with genomes of known virulent and representative strains of the genus *Aeromonas*. The loci of *mcr* genes will be described and compared with public genomes of *Aeromonas* for comparison of their genetic contexts using PATRICK 3.5.6 and phylogenetic relationship of proteins will be done by building a phylogenetic tree generated by the PhyML method of maximum likelihood and visualized by iTOL . The results reveal the complexity of the repertoire of virulence factors and the prevalence of *mcr-3* and *mcr-7* genes in the genomes of isolates from São Bento do Una. The relationship between virulence factors and resistance determinants was inversely proportional for the Aer294, Aer284 and Aer337 isolates, indicating the possibility of their involvement in the diarrheal outbreak that occurred in 2004.

Key words: *Aeromonas*. Virulence factors. Environmental reservoir. Antimicrobial resistance. *mcr-3/7*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Árvore filogenética indicando a relação entre a família, Enterobacteriaceae e os gêneros <i>Aeromonas</i> e <i>Vibrio</i>	16
Figura 2 – Distribuição das fontes de isolamento de <i>Aeromonas</i> que podem interagir com os seres humanos.....	17
Figura 3 – Contexto genético do gene <i>flaA</i> em <i>Aeromonas</i> spp.....	45
Figura 4 – Contexto genético do gene <i>aerA</i> em <i>Aeromonas</i> spp.....	46
Figura 5 – Contexto genético do gene <i>ast</i> em <i>Aeromonas</i> spp.....	47
Figura 6 – Contexto genético do gene <i>toxA</i> entre genomas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
Figura 7 – Contexto genético do gene <i>toxA</i> entre genomas de <i>Aeromonas dharkensis</i>	48
Figura 8 – Contexto genético do gene <i>entC</i> entre genomas de <i>Aeromonas</i> spp....	49
Figura 9 – Contexto genético do gene <i>entC</i> entre genomas de <i>Aeromonas</i> spp....	50
Figura 10 – Contexto genético do gene <i>hylA</i> entre genomas de <i>Aeromonas</i> spp...51	
Figura 11 – Contexto genético de <i>mcr-7-like</i> de <i>Aeromonas jandaei</i> Aer337.....	53
Figura 12 – Contexto genético de <i>mcr-3-like-c</i> de <i>Aeromonas jandaei</i> Aer337.....	55
Figura 13 – Contexto genético de <i>mcr-3.6</i> de <i>Aeromonas caviae</i> Aer268.....	56
Figura 14 – Contexto genético dos genes <i>mcr-3-like-b</i> e <i>mcr-3-like-c</i> entre de <i>Aeromonas</i> spp.....	57
Figura 15 – Árvore filogenética das proteínas de referência e variantes de MCR.	60
Figura 16 – Relação entre o número de fatores de virulência e os determinantes de resistência dos isolados de SBU.....	61

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Espécies atualmente reconhecidas dentro do gênero <i>Aeromonas</i>	18
Tabela 2 – Diferenciação de <i>Aeromonas</i> spp. e <i>Vibrio</i> spp.....	24
Tabela 3 – Características dos genomas dos isolados clínicos e ambientais <i>Aeromonas</i> spp. de SBU.....	30
Tabela 4 – Fatores de virulência identificados nos isolados de SBU.....	37
Tabela 5 – Genomas utilizados neste estudo.....	37
Tabela 6 – Distribuição dos fatores de virulência entre os genomas estudados.....	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO <i>AEROMONAS</i>	13
2.2	TAXONOMIA.....	15
2.3	ECOLOGIA.....	16
2.3.1	<i>Aeromonas</i> Em Amostras De Matrizes Aquáticas.....	16
2.3.2	<i>Aeromonas</i> Em Amostras De Alimentos.....	19
2.3.3	<i>Aeromonas</i> Em Amostras Clínicas.....	19
2.3.3.1	Infecções Intestinais.....	21
2.3.3.2	Infecções Extra Intestinais.....	22
2.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	22
2.5	VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE DE <i>AEROMONAS</i>	24
2.6	RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM <i>AEROMONAS</i>	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	CEPAS E GENOMAS.....	30
4.2	PESQUISA IN SILICO DOS GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS.....	31
4.3	ANÁLISE DO CONTEXTO GENÉTICOS DOS GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS.....	31
4.4	ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	32
4.5	ANÁLISE DOS DADOS.....	32
5	RESULTADOS OU RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	CEPAS E GENOMAS.....	32
5.2	IDENTIFICAÇÃO IN SILICO DE GENES CODIFICANTES DE FATORES DE VIRULÊNCIA.....	32
5.3	DISTRIBUIÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA ENTRE OS GENOMAS DE <i>AEROMONAS</i>	

ESTUDADOS.....	35
5.4 ANÁLISE DO CONTEXTO GENÉTICO DOS GENES DE VIRULÊNCIA.....	45
5.5 PESQUISA <i>IN SILICO</i> DOS GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.....	51
5.6 ANÁLISE DOS LOCI DOS GENES <i>MCR-3</i> E <i>MCR-7</i>	52
5.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS PROTEÍNAS VARIANTES DE <i>MCR</i>	58
5.8 RELAÇÃO FATORES DE VIRULÊNCIA E DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA.....	61
6 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64

1 Introdução

O gênero *Aeromonas*, pertencente à família *Aeromonadaceae*, compreende um grupo de bacilos Gram-negativos, autóctones do ambiente aquático, mas que podem ser isolados de solo, alimentos e causando infecções em seres humanos e outros animais (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). Sua disseminação e prevalência em ambientes aquáticos cria um alerta para produção de peixes e frutos do mar, sendo reconhecida como grave problema econômico para a aquicultura (ANJUR *et al.*, 2021). Pela alta distribuição desses microrganismos em diversos ambientes o contato com os seres humanos acaba sendo uma realidade, principalmente através de águas e alimentos contaminados, levando ao estabelecimento deste microrganismo como colonizador da microbiota intestinal e, oportunamente, causando infecções.

O primeiro relato de gastroenterites por *Aeromonas* foi de 1954 na Jamaica, sete anos depois outra cepa foi isolada de fezes diarreicas humanas e desde então esse microrganismo tem sido indicado como agente etiológico de doenças diarreicas. Nas últimas décadas, diversos estudos demonstram a importância de se tratar *Aeromonas* spp. como um enteropatógeno de importância médica (TEUNIS; FIGUEIRAS, 2016). Além das infecções intestinais, as bactérias do gênero *Aeromonas* foram relatadas atuando em infecções extra intestinais, principalmente em indivíduos imunodeprimidos, como quadros de septicemia, meningites, infecções oculares e osteomielites (ALBERT *et al.*, 2000) (CHOI *et al.*, 2008). De maneira geral, *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae* e *A. dharkensis* são as espécies mais frequentemente associadas a infecções em seres humanos e somam mais de 85% dos isolados clínicos do gênero. (VILA *et al.*, 2003) (AL-BENWAN *et al.*, 2007).

No ano de 2004, no município de São Bento do Una, localizado na região agreste do estado de Pernambuco, ocorreu um surto diarreico. Dentre os 145 casos de pacientes com coprocultura positiva, um total de 114 isolados de *Aeromonas* spp foram identificados como o único patógeno presente nas fezes dos pacientes acometidos (HOFER *et al.*, 2006). Por outro lado, estudos revelaram uma relação clonal entre 18 isolados de *Vibrio cholerae* O1 que também foram isoladas durante o surto diarreico, o que não foi identificado entre os isolados de *Aeromonas* isoladas (HOFER *et al.*, 2006). A etiologia do surto diarreico de São Bento do Una foi atribuída a *V. cholerae* O1, entretanto a alta prevalência de *Aeromonas* spp.

presente nas fezes de pacientes com diarreia reforça a necessidade de estudos envolvendo a caracterização destes isolados para entender os mecanismos pelos quais essas bactérias vêm se estabelecendo como patógeno oportunista.

A virulência de *Aeromonas* é complexa e de origem multifatorial, principalmente ligada aos componentes estruturais responsáveis pela adesão, motilidade, colonização bacteriana e escape do sistema imune do hospedeiro; produção de toxinas, citotoxinas e endotoxinas; proteínas extracelulares como amilase, quitinase, elastase, aerolisina, nuclease, gelatinase, lecitinase, lipase e proteases; sistema de secreção e aquisição de íons metálicos, como por exemplo o Fe⁺³ (BRAVO; FIGUERAS, 2020). Contudo, ainda são desconhecidos quais os conjuntos de fatores de virulência que levam ao estabelecimento do processo infeccioso, uma vez que eles não são exclusivos de cepas reconhecidamente virulentas.

O perfil de sensibilidade aos antibacterianos entre *Aeromonas* spp. pode variar de acordo com a espécie e sítio de isolamento. Até os dias atuais, a expressão induzível de beta-lactamases cromossômicas e a expressão de carbapenemases têm sido relatadas como o principal mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos dentro do gênero. Três classes de beta-lactamases são comumente identificadas em *Aeromonas* spp; uma cefalosporinase da classe C, uma penicilinase da classe D e uma metalo-beta-lactamase da classe B (GONZALEZ-AVILA *et al.*, 2021). Além disso, diversos estudos vêm relatando a prevalência de genes *mcr-3* e *mcr-7*, que estão relacionados à resistência às polimixinas, em genomas de *Aeromonas* (WANG *et al.*, 2021). De maneira geral, a literatura trata a possibilidade do gênero *Aeromonas* ser a fonte e reservatório de variantes dos genes *mcr* que configura esses microrganismos como um problema de saúde pública (SUN *et al.*, 2018) (KIEFFER *et al.*, 2019).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

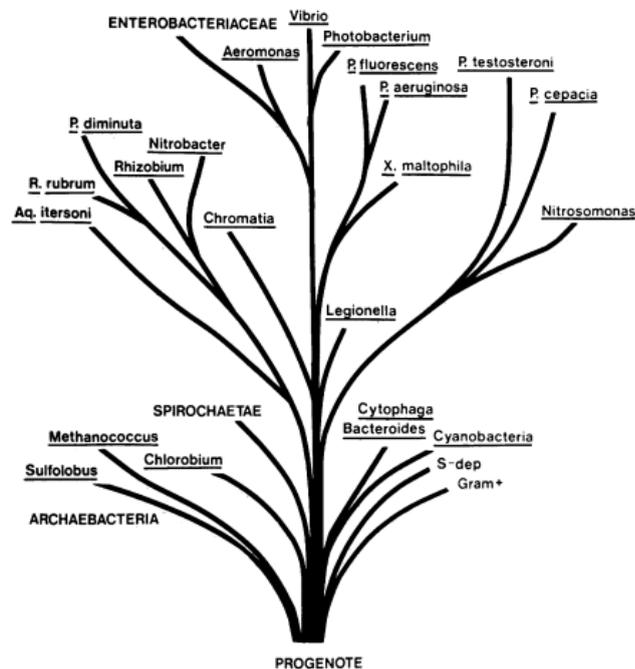
2.1 TAXONOMIA DO GÊNERO *AEROMONAS*

A taxonomia do gênero *Aeromonas* é complexa e tem sido submetida a várias revisões ao longo do tempo devido às novas espécies descritas e a novos critérios de diagnóstico, principalmente, utilizando técnicas moleculares (ALPERI *et al.*, 2008). As espécies do gênero *Aeromonas* durante vários anos foram agrupadas em diversos gêneros como *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Proteus* e *Vibrio* devido a características fenotípicas semelhantes (MARTINEZ-MURCIA *et al.*, 1992). Com as tecnologias de sequenciamento de genomas a análises filogenéticas foi possível realizar a reclassificação de espécies de maneira mais confiável, tendo como base para essa análise por exemplo os genes *housekeeping* 's.

Estudos de análise filogenética que utilizaram os genes 5S rRNA e 16S rRNA demonstraram que *Aeromonas* spp. agrupa em um ramo distante das bactérias da família *Vibrionaceae* na árvore filogenética e também difere das enterobactérias, indicando duas famílias diferentes, dessa forma foi proposta a família *Aeromonadaceae* e a Figura 1 apresenta o estudo filogenético baseado nas sequências dos genes 16S rRNA realizado por Colwell *et al.*, (1986).

Em 2005 eram 18 espécies descritas de acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* e na última edição do mesmo manual já foram descritas mais 8 espécies, nem todas sendo relatadas a infecções em seres humanos. Com a descrição de novas espécies atualmente são reconhecidas um total de 26 e estão listadas na Tabela 1.

Figura 1. Árvore filogenética indicando a relação entre a família, *Enterobacteriaceae* e os gêneros *Aeromonas* e *Vibrio*.



Fonte: Colwell *et al.*, 1986

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO *AEROMONAS*

O termo *Aeromonas* (“Aer” que significa ar ou gás e “monas” que significa unidade) foi proposto por Kluver e Van Neil no ano de 1936 para abranger bactérias produtoras de gás. Apenas em 1943 que o termo *Aeromonas* foi utilizado para denominar o gênero bacteriano (PESSOA *et al.*, 2019). O gênero *Aeromonas* abriga 32 espécies que apresentam-se como bacilos Gram-negativos, não-esporulados de aproximadamente 1-3 µm de comprimento. Além disso, são anaeróbios facultativos, capazes de reduzir nitrato a nitrito, produtores de oxidase, catalase e resistentes ao agente vibriostático O/129 (2,4 diamino-6,7-di-isopropil timidina) e são caracterizados por tolerar concentrações crescentes de NaCl variando entre 0,3 a 5% (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). Por fim, algumas características são variáveis dentre as cepas, como por exemplo, a capacidade hemolítica, produção de citotoxinas, enterotoxinas, proteases, adesinas e endotoxinas.

Dentro do gênero *Aeromonas* algumas espécies apresentam crescimento ótimo em temperaturas variando entre 35 e 37 °C, sendo chamadas de mesofílicas. As *Aeromonas* spp. mesofílicas costumam ser bactérias móveis apresentando flagelos polares e, eventualmente, flagelos laterais. Essas características parecem estar relacionadas com seu estabelecimento como patógeno humano, como no caso das espécies *A.caviae*, *A.veronii*, *A. hydrophila*, *A. dhakensis* e *A. jandaei*. Outro grupo de espécies de *Aeromonas* apresentam crescimento ótimo em temperaturas entre 22 e 25 °C, sendo classificadas como psicrotólicas, e costumam ser imóveis estando relacionadas a doenças em peixes, anfíbios e répteis, como no caso de *A. salmonicida* e *A. média* (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

Os membros do gênero *Aeromonas* são ubíquos do ecossistema aquáticos, principalmente os marinhos e seu isolamento é comumente relatado em peixes e frutos do mar. Dessa forma, *Aeromonas* spp. são patógenos de interesse principalmente nas práticas de aquicultura, provocando doenças como septicemia e furunculose e consequente danos importantes na produção de peixes e frutos do mar. Além disso, *Aeromonas* spp. podem ser isoladas de alimentos, como laticínios, carne bovina e suína (PESSOA *et al.*, 2019). Em seres humanos esses microrganismos também são isolados atuando como colonizadores do trato gastrointestinal e, ocasionalmente, causando gastroenterites, que quando não tratadas da maneira correta podem evoluir um processo infeccioso sistêmico como uma septicemia. Além desses sítios infecciosos, *Aeromonas* spp. são capazes de atuar como patógenos de tecidos moles, causando infecções oculares, respiratórias e articulares (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

2.3 ECOLOGIA DO GÊNERO *AEROMONAS*

2.3.1 *Aeromonas* spp. Em Ambientes Aquáticos

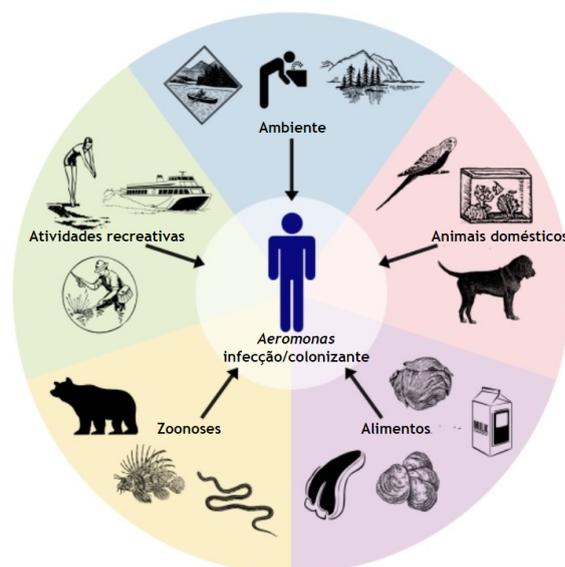
As espécies pertencentes ao gênero *Aeromonas* são autóctones de ambientes aquáticos, sendo frequentemente isoladas de águas poluídas, águas de poços, águas marés e de rios e, até mesmo, água clorada (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). A distribuição em ambientes aquáticos combinada a capacidade desses microrganismos de se multiplicarem e produzir biofilmes estão ligadas a sua distribuição de sistemas de distribuição de água e por isso assumem um risco de

contaminação de matrizes aquáticas. *Aeromonas hydrophila* está incluída na lista de candidatos contaminantes microbianos (*Contaminant Candidate List 2*) organizada pela Agência de Proteção Ambiental Americana (*U.S Environmental Protection Agency*), que recomenda estudos epidemiológicos da presença desses microrganismos em fontes de água para consumo humano. Acredita-se que a contaminação de frutas e vegetais por *Aeromonas* seja o principal meio de transmissão que está relacionada a infecções por esses microrganismos em humanos (ANJUR *et al.*, 2021).

Além dos ambientes aquáticos as espécies de *Aeromonas* também são isoladas de solos, alimentos enlatados, carnes, animais domésticos e, até mesmo do próprio homem atuando como colonizante do trato gastrointestinal (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

Essa diversidade de sítios de isolamento de bactérias desse gênero facilita sua interação com os seres humanos. A Figura 2 apresenta um desenho esquemático que resume as principais vias pelas quais os seres humanos podem ser infectados ou colonizados por *Aeromonas spp.*. Apesar de apresentar a matriz aquática como a principal fonte de transmissão desse microrganismo, o constante processo de expansão urbana apresenta um potencial risco para o contato e consequente infecção por *Aeromonas* de origem zoonótica.

Figura 2. Distribuição das fontes de isolamento de *Aeromonas* que podem interagir com os seres humanos.



Fonte: JANDA e ABBOTT, 2010. adaptado

Tabela 1. Espécies atualmente reconhecidas dentro do gênero *Aeromonas*

Espécie	Cepa	Origem	Referência
<i>A. allosaccharophila</i>	CECT 4199T	Peixe	Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 1992b
<i>A. aquariorum</i>	DSM18362T	Matriz aquática	Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 2008
<i>A. australiensis</i>	CECT 8023T	Matriz aquática	Aravena-Roman <i>et al.</i> , 2013
<i>A. bestiarum</i>	ATCC 51108T	Peixe doente	Ali <i>et al.</i> , 1996
<i>A. bivalvium</i>	CECT 7113	Molusco bivalve	Miñana-Galagis <i>et al.</i> , 2007
<i>A. cavernicola</i>	CECT 7862T	Matriz aquática	Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 2013
<i>A. diversa</i>	CECT 4254T	Ferida	Miñana-Galagis <i>et al.</i> , 2010
<i>A. encheleia</i>	CECT 4342T	Peixe	Esteve <i>et al.</i> , 1995b
<i>A. eucrenophila</i>	NCIMB 74T	Peixe	Schubert e Hegazi, 1988
<i>A. fluvialis</i>	CECT 7401	Matriz aquática	Alperi <i>et al.</i> , 2010a
<i>A. hydrophila</i>	ATCC 7966T	Leite	Stainer, 1943
<i>A. jandaei</i>	ATCC 49568T	Fezes humanas	Carnahan <i>et al.</i> , 1991a
<i>A. media</i>	ATCC 33907T	Matriz aquática	Allen <i>et al.</i> , 1983
<i>A. molluscorum</i>	CECT 5864	Molusco bivalve	Miñana-Galagis <i>et al.</i> , 2004
<i>A. piscicola</i>	S1.2T	Peixe	Beaz-Hidalgo <i>et al.</i> , 2009
<i>A. popoffii</i>	LMG 17541T	Matriz aquática	Huys <i>et al.</i> , 1997
<i>A. rivuli</i>	CECT 7518T	Matriz aquática	Figueras <i>et al.</i> , 2011a
<i>A. salmonicida</i>	NCIMB 1102T	Salmão	Griffin <i>et al.</i> , 1953
<i>A. sanarellii</i>	CECT 7402T	Ferida	Alperi <i>et al.</i> , 2010b
<i>A. schubertii</i>	ATCC 43700T	Abscesso cutâneo	Hickman-Brenner <i>et al.</i> , 1988
<i>A. simiae</i>	IBS S6874T	Fezes de macaco	Harf-Monteil <i>et al.</i> , 2004
<i>A. sobria</i>	NCIMB 12065T	Peixe	Popoff e Veron 1976
<i>A. taiwanensis</i>	CECT 7403T	Ferida	Alperi <i>et al.</i> , 2010b
<i>A. tecta</i>	CETC 7082T		Demarta <i>et al.</i> , 2008
<i>A. trota</i>	ATCC 49657T	Fezes humanas	Carnahan <i>et al.</i> , 1991a
<i>A. veronii</i>	ATCC 35624T	Muco	Hickman-Brenner <i>et al.</i> , 1987

Fonte: autor.

2.3.2 *Aeromonas* spp. Em Amostra De Alimentos

As espécies do gênero *Aeromonas* já foram isoladas de amostra de frutas, vegetais, carnes, derivados de leite e frutos do mar (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). Alguns autores explicam que as condições em que esses alimentos são armazenados justificam a proliferação de bactérias do gênero *Aeromonas*. A temperatura de armazenamento de refrigeradores convencionais gira em torno de 2 a 10°C e estudos já relataram a presença de *Aeromonas* viáveis a esta faixa de temperatura. Outros fatores como pH em torno de 5 e concentração de cloreto de sódio até 4% podem estar relacionados a contaminação desses alimentos por esses microrganismos.

As espécies *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* foram algumas das espécies capazes de causar infecções em seres humanos e foram identificadas em amostras de alimentos (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). Cebola, tomate, alface, pepino e cenoura foram algumas das hortaliças que a presença de *Aeromonas* foi identificada. Dentre as espécies mais predominantes também encontram-se *A. hydrophila*, *A. caviae*.

Acredita-se que a porta de entrada para infecções intestinais causadas por *Aeromonas* sejam amostras de alimentos contaminados. Alguns autores relatam que as gastroenterites por *Aeromonas* são subdiagnosticadas ou equivocadamente diagnosticadas por apresentarem limitações bioquímicas já descritas nos tópicos anteriores. Dessa forma, a presença de casos de gastroenterites causados por *Aeromonas* pode ser subnotificada principalmente em países subdesenvolvidos como o Brasil.

2.3.3 *Aeromonas* spp. Como Patógeno

Aeromonas spp. vêm recebendo cada vez mais atenção pela comunidade médica e científica por ser um patógeno emergente que causa diversas doenças em indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos.

Aeromonas está associada a uma diversidade de infecções em animais de sangue quente e frio, incluindo répteis, anfíbios, peixes e humanos. Em lagartos, cobras e jacarés os casos de estomatite ulcerativa e pneumonia são frequentes. Relatos de septicemia em cachorros, pneumonia em golfinhos e diarreia em porcos

também foram relatados. As infecções relacionadas aos peixes também chamam atenção, furunculose, lesão necrótica focal e septicemia são algumas das infecções neste grupo de animais (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). Outra infecção bastante conhecida é a “doença vermelha da barbatana” sendo caracterizada pela presença de nódulos hemorrágicos e erosão nas escamas.

As doenças em peixes são um fator limitante na economia e no desenvolvimento dos sistemas de aquicultura. A distribuição natural de *Aeromonas* em ambientes aquáticos se apresenta como um desafio para o controle da sua interação com os peixes e a possível infecção (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

No homem as infecções causadas por *Aeromonas* podem ser classificadas, resumidamente, em: infecções intestinais, infecções de feridas e tecidos moles, septicemia e diversos outros processos infecciosos que incluem algumas doenças menos frequentes (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020), como por exemplo as infecções do trato respiratório e urinário, infecções oculares e ósseas. Acredita-se que a incidência de casos de infecção por *Aeromonas* varie de acordo com a localização e esteja associada aos maus hábitos de higiene e condições de saneamento básico precários (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

Diversos estudos vêm demonstrando uma maior prevalência de quatro espécies do gênero *Aeromonas*: *A. caviae* (37,26%), *A. veronii* (23,49%), *A. dhakensis* (21,54%) e *A. hydrophila* (13,07%) como os principais patógenos associados à infecção em humanos (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). Também são sinalizadas como de importância médica as espécies de *A. jandaei* (0,43%) e *A. trota* (0,27%), mesmo apresentando poucos relatos quando comparadas às outras espécies. Atualmente, *A. dhakensis* e *A. hydrophila* são as espécies reconhecidamente mais virulentas dentro do gênero (BRAVO; FIGUERAS, 2020). Por fim, quanto à recente espécie *A. australiensis* ainda não se conhece sua importância médica devido a dados insuficientes sobre sua patogenicidade e virulência e ao seu raro isolamento (ARAVENA-ROMA, *et al.*, 2013).

Infecção associadas a mais de uma bactéria na mesma amostra clínica são definidas como infecção polimicrobiana ou mista. De maneira geral, as infecções polimicrobianas envolvendo as bactérias do gênero *Aeromonas* são comumente relatadas. O isolamento de *Aeromonas* a outra bactéria vem sendo relatada em infecções do trato respiratório, infecções de feridas, gastroenterites e bacteremia. A

dependendo do tipo da infecção há uma prevalência quanto às bactérias que são isoladas em conjunto com *Aeromonas*. Dessa forma, em infecções polimicrobianas do trato gastrointestinal envolvendo *Aeromonas* é comumente isolado *Campylobacter* e *Salmonella*, enquanto nas infecções de feridas a bactéria prevalente é o *Staphylococcus aureus*. (BRAVO; FIGUERAS, 2020).

2.3.3.1 Infecções intestinais

As gastroenterites são as infecções por *Aeromonas* mais frequentes e o primeiro isolamento deste microrganismo atuando como agente causador de gastroenterites foi em no ano de 1961. As gastroenterites causadas por *Aeromonas* podem variar de apresentações clínicas moderadas a graves e a severidade está relacionada ao balanço entre os fatores de virulência do patógeno e o estado do sistema imunológico do hospedeiro (FOUQUET *et al.*, 2018). De maneira geral, as gastroenterites por *Aeromonas* apresentam-se clinicamente como uma diarreia aquosa, de curta duração e autolimitada. Em casos mais graves, pode-se apresentar como uma desintéria, com fezes sanguinolentas, vômitos e dores abdominais. (TEUNIS *et al.*, 2016)

Em 1974 e 1995, respectivamente Borsh *et al.* e Sugita *et al.* relataram a presença de bactérias do gênero *Aeromonas* em fezes humanas, de animais terrestres e animais aquáticos apresentando-se como membro da microbiota transitória do trato gastrointestinal. Acredita-se que a presença desses microrganismos esteja relacionada a contaminações de matrizes aquáticas e alimentares.

Apesar de diversos relatos envolvendo infecções do trato gastrointestinal por *Aeromonas* o seu papel como enteropatógeno vinha sendo questionado nos últimos anos. Atualmente, a enteropatogenicidade de *Aeromonas* vem sendo cada vez mais estabelecida através de estudos de Teunis e Figueiras 2016 que utilizaram cepas isoladas de surtos diarreicos em seres humanos usando modelos *in vivo* de infecção e concluíram que apesar de nem todas as espécies causar diarreia líquida, *Aeromonas* spp. devem ser tratadas como enteropatógenos, pois assim como bactérias do gênero *Campylobacter* e *Salmonella*, exposição a baixas doses desses mesmos microrganismos pode levar ao estabelecimento da infecção, ainda que apresentem sintomatologia leve ou até mesmo ausência de sintomas.

2.3.3.2 Infecções extraintestinais

As infecções de feridas são a segunda maior fonte de amostras clínicas *Aeromonas*. De maneira geral, elas podem variar desde infecções mais superficiais até infecções profundas, acometendo tendões, músculos e ossos. As infecções de ferimentos são iniciadas pelo contato com amostras contaminadas por *Aeromonas*, principalmente matrizes aquáticas e amostras de solo, através da superfície descontinuada da pele, quebrando a principal barreira física do sistema imune inato, por meio de abrasões ou cortes (ANJUR et al., 2021).

As infecções de feridas podem evoluir para fascite necrosante, também conhecida como doença carnívora, e essa progressão normalmente está associada a pacientes imunocomprometidos. Resumidamente a fascite necrosante apresenta um quadro clínico de hipotensão, febre persistente, necrose e gangrena que pode se tornar uma infecção fatal. De maneira geral *A. hydrophila* está comumente associada aos casos de fascite necrosante (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). O caso de uma jovem imunocompetente ganhou repercussão mundial ao desenvolver fascite necrosante após a exposição de uma ferida à água de um rio que resultou na amputação de todas as extremidades.

São relatadas infecções extra intestinais causadas por *Aeromonas* como septicemias, infecções do trato respiratório e urinário, endocardite, osteomielite, amigdalite, otite média e síndrome uremica hemolítica. De maneira geral, as infecções extra intestinais por *Aeromonas* estão envolvidas com pacientes em processos neoplásicos, com doenças hematológicas crônicas, disfunções hepatobiliares ou com outras enfermidades (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico diferencial de *Aeromonas* não é feito na rotina da maioria dos laboratórios de microbiologia clínica, apesar de alguns autores alertam da importância da investigação associada a gastroenterites em pacientes imunodeprimidos (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). Resumidamente as amostras suspeitas de conter *Aeromonas* são enriquecidas em água peptonada

alcalina e incubadas a 35-37°C durante 18-24h até atingirem sua fase exponencial de crescimento. Posteriormente é realizado o semeio em placas de ágar sangue suplementado com ampicilina com o objetivo de identificar duas características presentes na maioria das espécies do gênero: a resistência intrínseca a ampicilina e hemólise do tipo beta. As colônias crescidas e com características de *Aeromonas* são submetidas ao teste da oxidase com o objetivo de diferenciar as bactérias da família *Enterobacteriaceae* que não apresentam reação positiva.

Neste ponto da identificação laboratorial fenotípica se faz necessário realização de testes específicos para diferenciar as espécies de *Aeromonas* de *Vibrio* e podem ser feitos os testes de crescimento na ausência de concentrações, resistência ao O/129 e descarboxilação da ornitina, lisina e hidrólise da arginina como apresentado no Quadro 2. A confusa identificação manual das bactérias do gênero *Aeromonas* leva ao diagnóstico equivocado dentro de outros gêneros bacterianos como *Vibrio* e *Plesiomonas* (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

A automação e os sistemas comerciais como o API 20E e o Vitek já fazem parte da maior parte dos laboratórios de microbiologia clínica e também apresentam limitações para a identificação de *Aeromonas*, principalmente a nível de espécie. De maneira geral, a maior parte dos resultados liberados erroneamente por esses sistemas são de cepas características de *A. hydrophila* (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). Esses resultados trazem problemas a nível de prevalência de espécies e estudos epidemiológicos que são a base para a promoção de políticas de saúde.

Dessa forma, diversos autores indicam a identificação molecular (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020) de *Aeromonas* apesar da realidade das localidades que apresentam prevalência de casos de *Aeromonas* está situada em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento em que a biologia molecular não é usada como rotina nos laboratórios de microbiologia clínica.

O sequenciamento do gene que codifica o RNA ribossomal 16S é considerado uma ferramenta de identificação da maior parte de espécies de *Aeromonas*. Entretanto existem algumas limitações devido ao quantitativo de genomas de *Aeromonas* disponíveis e a similaridade das sequências entre as cepas disponíveis. Dessa forma, em alguns casos o sequenciamento gene 16S se torna inconclusivo para a identificação de espécies de *Aeromonas*. Estudos de de Melo *et al.*, 2019 demonstraram que mesmo utilizando a análise filogenética multilocus, uma das mais

recentes técnicas de identificação bacteriana, ainda sim algumas cepas de *Aeromonas* são identificadas de maneira errônea, sendo essencial a identificação por meio da análise completa do genoma de alta resolução para a correta identificação de cepas de *Aeromonas* ambíguas.

Tabela 2. Diferenciação de *Aeromonas* spp. e *Vibrio* spp.

Organismo	Cresc. em NaCl a 0%	O/129	LDC	ADH	ODC
<i>Aeromonas</i> spp.	+	R	+	+	-
<i>Vibrio cholerae/mimicus</i>	+	S	+	-	+
Outros <i>Vibrio</i>	-	S	-	+	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	+	v	+	+	+

Legenda: LDC: Lisina descarboxilase; ADH: arginina desidrolase; ODC: ornitina descarboxilase, R: resistente; S: sensível; V: variável; +: reação positiva; -: reação negativa.

Fonte: JANDA e ABBOTT, 2010. adaptado

2.5 VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE EM *AEROMONAS*

A virulência de *Aeromonas* spp. é complexa e de origem multifatorial, principalmente ligada aos componentes estruturais responsáveis pela adesão, motilidade, colonização bacteriana e escape do sistema imune do hospedeiro; produção de toxinas, citotoxinas e endotoxinas; proteínas extracelulares como amilase, quitinase, elastase, aerolisina, nuclease, gelatinase, lecitinase, lipase e proteases; sistema de secreção e aquisição de íons metálicos (Fe^{+3}) (BRAVO; FIGUERAS, 2020). Acredita-se que um conjunto de fatores de virulência esteja relacionado a presença destes microrganismos em sustos. Contudo, esse conjunto de fatores de virulência levam ao estabelecimento do processo infeccioso ainda desconhecido já que eles não são exclusivos de cepas reconhecidamente virulentas.

De maneira geral, a detecção de fatores de virulência em *Aeromonas* spp. está relacionada ao seu potencial patogênico. Esses microrganismos vêm ganhando espaço na prática clínica por atuarem como patógenos de infecções intestinais e extraintestinais. Dentre as espécies mais virulentas se destaca *A. hydrophilla* e *A. dharkesis*, que se apresentam semelhantes às análises filogenéticas (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

Acredita-se que o conjunto de fatores de virulência presente nos genomas de *Aeromonas* pode estar relacionado a seu tipo de infecção. Cepas isoladas de infecções intestinais comumente apresentam genes relacionados à produção de hemolisinas, enquanto cepas isoladas de infecções extra intestinais comumente apresentam a camada-S como fator de virulência mais prevalente (TOMÁS *et al*, 2012).

As diferentes manifestações clínicas, principalmente vinculadas às infecções intestinais por *Aeromonas* spp. sugerem que a patogenicidade desses microrganismos possa estar relacionada não só a um fator de virulência específico, mas sim a um conjunto de fatores de virulência que em diferentes combinações. Essa associação já é descrita dentre os diferentes patotipos de *E. coli* que atuam em infecções intestinais.

Os flagelos auxiliam na motilidade bacteriana durante o processo infeccioso e induzem a resposta imunológica do hospedeiro, atuando como importante fator de virulência. As *Aeromonas* mesofílicas apresentam um sistema de motilidade incomum dentre as bactérias móveis, sendo capazes de expressão dois flagelos distintos: um flagelo polar, constitutivo e que está relacionado com a motilidade bacteriana em meios líquidos e outro flagelo lateral, que permite a aderência bacteriana em superfícies ou meios viscosos, no qual sua expressão foi identificada em algumas cepas do gênero (Merino *et al*, 2006). Merino *et al.*, (2006) demonstraram que quando a bactéria se encontra em superfícies viscosas a expressão do flagelo polar é reprimida e concomitantemente a expressão do flagelo lateral é induzida.

De maneira geral o flagelo polar está relacionado a colonização intestinal, enquanto o flagelo lateral contribui para a formação do biofilme bacteriano a partir do *quorum sensing* (TOMÁS *et al*, 2012). Acredita-se que quando agrupadas na forma de biofilmes as bactérias aumentam a expressão de fatores de virulência o que pode indicar que a presença do flagelo lateral seja, de fato, importante para a

patogenicidade e virulência de *Aeromonas* spp (MERINO *et al.*, 2006).

Os fatores de virulência relacionados à motilidade bacteriana, como por exemplo os flagelos polares e laterais já foram caracterizados quanto a importância na motilidade em superfícies sólidas e líquidas, tendo importante papel na colonização intestinal (SEN; LYE, 2007). As *pili* estão envolvidas no processo de adesão e formação de biofilme, desempenhando papel importante para as infecções intestinais.

Os sistemas de secreção também são importantes para a virulência de *Aeromonas* spp. Resumidamente, o gênero *Aeromonas* abriga três sistemas de secreção bem caracterizados: o sistema de secreção do tipo II (T2SS), o sistema de secreção do tipo III (T3SS) e o sistema de secreção do tipo VI (T6SS). O T2SS está relacionado ao transporte de proteínas como aerolisinas, DNases, lipases e proteases pela membrana externa da bactéria (MALTZ; GRAF, 2011). Os fatores de virulência T3SS e T6SS são descritos como um aparelho injetável do tipo *phagetail-spike* e responsável pela translocação de fatores de virulência diretamente no citoplasma da célula alvo (SHA *et al.*, 2013).

A produção de enterotoxinas também é outra característica importante para a virulência e patogenicidade de *Aeromonas*. Resumidamente, as enterotoxinas de *Aeromonas* podem apresentar um efeito citotóxico, como o produto dos genes *act*, *hylA* e *aerA*, ou citotônico, como por exemplo os produtos dos genes *alt* e *ast*. O efeito citotóxico atua promovendo o dano nas células a nível de epitélio intestinal, levando a degradação das microvilosidades intestinais e atividade hemolítica (WANG *et al.*, 2003). Por outro lado, as enterotoxinas que produzem um efeito citotônico não geram de fato um dano celular e estão ligadas ao aumento da produção de muco pelo epitélio intestinal (CHOPRA *et al.*, 1999).

A enterotoxina *aerA* apresenta efeito citotóxico é produzida como um monômero de pro-aerolisina e secretada para o meio extracelular pelo T2SS. A pró-aerolisina é convertida por proteases bacterianas e do hospedeiro a aerolisina. Quando em contato com proteínas expressas na membrana da célula alvo a aerolisina que muda sua conformação, perdendo o peptídeo C-terminal e transformando-se em um anel heptamérico, β -poro, de natureza anfipática que se insere na membrana da célula alvo. Os β -poros induzem o influxo de cloreto e potássio e o influxo de cálcio. A entrada de fluidos do meio externo e a posterior vacuilação do retículo endoplasmático levam a morte celular (DEGIACOMI *et al.*,

2013).

A enterotoxina alt apresenta efeito citotônico e seu mecanismo de ação está relacionado ao aumento dos níveis de cAMP e prostaglandinas pelas células do epitélio intestinal induzindo a produção de muco. De maneira geral, elas podem ser divididas quanto à estabilidade ao calor sendo a enterotoxina termolábil (Alt) e termoestável (Ast) (CHOPRA *et al.*, 1999).

A escassez de estudos sobre a expressão desses fatores de virulência envolvendo modelos animais dificulta o entendimento de quais características genéticas são importantes na infecção por *Aeromonas* e pouco se sabe sobre a diferença de patogenicidade entre as suas espécies. O avanço nas tecnologias para identificação e estudo sobre fatores de virulência e patogenicidade bacteriana tem permitido a identificação e caracterização de diversos novos fatores, e atualmente, com o crescente número de genomas sequenciados, genes relacionados à virulência podem ser identificados em comparação com aqueles identificados em cepas hipervirulentas, organizadas em um dos bancos de dados (SESHADRI *et al.*, 2006).

2.6 RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM *AEROMONAS*

O perfil de sensibilidade aos antibacterianos entre *Aeromonas* spp. pode variar de acordo com a espécie e sítio de isolamento (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). Até os dias atuais, a expressão induzível de beta-lactamases cromossômicas e a expressão de carbapenemases têm sido relatadas como o principal mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos dentro do gênero. Três classes de beta-lactamases são comumente identificadas em *Aeromonas* spp; uma cefalosporinase da classe C, uma penicilinase da classe D e uma metalo-beta-lactamase da classe B (GONZALEZ-AVILA *et al.*, 2021).

As polimixinas (polimixina B e colistina) são lipopeptídeos antimicrobianos que foram introduzidas na prática clínica na década de 1950 e seu manejo descontinuado devido à sua alta neurotoxicidade e nefrotoxicidade. Entretanto, as polimixinas continuaram sendo utilizadas, até o ano de 2012, principalmente de maneira profilática, na criação industrial de aves, suínos e peixes (RIGATTO *et al.*, 2019). A colistina foi re-introduzida na prática clínica após modificações na

estruturais e a consequente diminuição da sua toxicidade e, principalmente, como última opção terapêutica para o tratamento de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) causadas por fenótipos de multirresistência aos antimicrobianos (MDR) em BGNs e enterobactérias produtoras de carbapenemase (LI *et al.*, 2019).

Os BGNs desenvolvem resistência às polimixinas principalmente através de modificações na porção do lipídeo A do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Em geral, a resistência a polimixina pode ser atribuída a expressão induzível de enzimas modificadoras do LPS bacteriano, como a fosfoetanolamina (PEtN) transferase, que decoram a porção do lipídeo A da maioria dos BGNs levando alteração na carga residual dessa molécula e impossibilitando a interação com a polimixina (LI *et al.*, 2019). Além disso, recentemente foram descritas mutações cromossômicas em sistemas reguladores transcricionais de dois componentes TCRs (do inglês *Two Component Regulatory Systems*) como PhoPQ, PmrAB e CrrAB que também estão associadas a resistência intrínseca a polimixina (LI *et al.*, 2019).

Um total de 10 variantes de proteínas MCR (MCR-1 ao MCR-10) já foram descritas e análises filogenéticas sugerem que o MCR-1 codificado por plasmídeo, provavelmente derivou de uma PEtN transferase cromossômica de *Moraxella* (LING *et al.*, 2017). O MCR-4 parece ser originado de *Shewanella* e o MCR-9 e MCR-10, também codificados por plasmídeo, apresentam alta similaridade com as proteínas cromossômicas do tipo MCR de *Buttiauxella* (KIEFFER *et al.*, 2019). Por fim, especula-se que as proteínas MCR-3 e MCR-7 sejam originárias de espécies semelhantes a fosfoetanolamina transferases cromossomiais de *Aeromonas* (WANG *et al.*, 2021) levando à sugestão de que membros deste gênero podem ser a fonte e reservatórios dos genes *mcr-3* e *mcr-7*. A família MCR-1 e MCR-3 tem a maior quantidade de variantes alélicas quando comparada às outras famílias de MCR (SUN *et al.*, 2018) (KIEFFER *et al.*, 2019). Acredita-se que essas variantes de *mcr-3* possam estar surgindo por meio de mecanismos de recombinação desses genes em genomas de *Aeromonas*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar geneticamente os sete genomas dos isolados de *Aeromonas* spp. envolvidos no surto diarreico no município de São Bento do Una.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o repertório de fatores de virulência nos genomas dos isolados de *Aeromonas* envolvidos no surto de São Bento do Una
- Descrever os genes de resistência a antibióticos nos genomas dos isolados de *Aeromonas* envolvidos no surto de São Bento do Una

4 METODOLOGIA

4.1 CEPAS E GENOMAS

Um total de 71 genomas representativos do gênero *Aeromonas* formam o grupo de referência deste estudo, sendo 25 oriundos de amostras ambientais isolados de matrizes aquáticas e amostras de solo e 46 oriundos de infecções de peixes e infecções em seres humanos isolados a partir de amostras da corrente sanguínea, urina, fezes, feridas, escarro, abscesso, líquido peritoneal, líquido cefalorraquidiano. Os genomas do grupo de referência foram obtidos por meio do banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), tendo como critério de inclusão o conteúdo GC e quantidade de *reads* dos genomas, além da disponibilidade dos dados quanto ao seu hospedeiro, sítio de isolamento e localização geográfica. Os dados destes genomas estão disponíveis no Quadro 5.

4.2 PESQUISA *IN SILICO* DOS GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Os genomas utilizados neste estudo foram baixados em formato *fasta* e serviram com *input* para a plataforma do Virulence Factor DataBase (VFDB), a partir da ferramenta VFAnalyzer (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi>). Resumidamente, o primeiro passo do VFAnalyzer para a predição dos genes de virulência é a construção de um grupo de genes ortólogos dentro do genoma de consulta e utilizando os genomas de referência pré-analisados do VFDB. Em seguida, ele realiza pesquisas de similaridade de sequências entre os conjuntos pré-construídos do banco de dados para identificar possíveis fatores de virulência típicos e atípicos dos genomas analisados (LIU *et al.*, 2021). Dessa forma, utilizando o genoma de *A. hydrophila* ML09-119 como referência na plataforma e a partir dele foram feitas as predições para os genes de virulência.

Para a pesquisa dos genes de resistência aos antibióticos e plasmídeos os arquivos em formato *fasta* foram submetidos a ferramenta ABRicate hospedada na plataforma Galaxy Version 1.0.1 (<https://usegalaxy.org/>). De maneira geral, o ABRicate faz uma busca por determinantes de resistência a antibióticos e regiões conservadas de plasmídeos como as *reps* nos genomas submetidos que apresentam similaridade com aquelas depositadas em diversos bancos de dados de

resistência bacteriana como por exemplo o CARD, ResFinder, PlasmidFinder e NCBI. Para este estudo, foram utilizados parâmetros de no mínimo 60% de identidade e 40% de cobertura para a realização da triagem inicial. Posteriormente, foi realizada uma curadoria manual para selecionar os genes de resistência aos antibióticos preditos que apresentavam não apresentaram *gap's*, identidade >80% e cobertura >90%.

4.3 ANÁLISE DO CONTEXTO GENÉTICOS DOS GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Os loci dos genes de virulência e resistência aos antibióticos identificados nos genomas deste estudo serão descritos e comparados com genomas públicos de *Aeromonas*. A análise dos diferentes contextos genéticos foram feitas utilizando o BV-BRC 3.26.4 (<https://www.bv-brc.org/>).

4.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A relação entre as variantes do gene *mcr-3* e *mcr-7* de Aer337 e as outras variantes descritas e depositadas no ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) foi determinada com construção de uma árvore filogenética gerada por alinhamento dos genes *mcr* pelo método PhyML de máxima verossimilhança e visualizadas pelo iTOL (<https://itol.embl.de/>).

4.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram avaliados quantitativamente e qualitativamente pela análise descritiva dos dados obtidos e armazenados em banco de dados pelo software Excel® (Microsoft Corporation).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CEPAS E GENOMAS

Um total de 71 genomas de *Aeromonas* spp. foram utilizados neste estudo, destes, sete genomas compõem o grupo representativo do surto diarreico ocorrido

no município de São Bento do Una (SBU), localizado no Agreste do estado de Pernambuco. O grupo de cepas representativo do surto diarreico do município de SBU (*A. caviae* Aer268 e Aer593, *A. dharkensis* Aer283, *A. hydrophila* Aer284, *A. australiensis* Aer294, *A. jandaei* Aer337, *A. trota* Aer371) tiveram seu genoma sequenciado em estudo prévio utilizando a plataforma Miseq, anotados e montados em estudo prévio ((DE MELO *et al.*, 2019). Os detalhes do sequenciamento dos genomas estão dispostos no Quadro 4. Os outros 64 genomas são representativos do gênero *Aeromonas* e formam o grupo de referência que compõe o cepas que foram isoladas de diversos sítios de infecção em seres humanos, infecções de peixes, amostras de solo e matrizes aquáticas. Os genomas utilizados e suas características estão listados no Quadro 3.

Tabela 3. Características dos genomas dos isolados clínicos e ambientais *Aeromonas spp.* de SBU.

GENOMAS	Aer268	Aer283	Aer284	Aer294	Aer337	Aer371	Aer593
Quantidade de bases	4542721	4737819	4819727	4641951	4706329	4325934	4311905
N50	18363	80856	64276	25103	170375	37645	48422
Conteúdo GC (%)	61,20%	61,80%	61,20%	57,60%	58,50%	60,00%	61,80%
Predições genéticas (CDS)	4827	4496	4846	4309	4630	4351	4169

Fonte: autor

5.2 IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DE GENES CODIFICANTES DE FATORES DE VIRULÊNCIA

Um total de 445 genes codificadores de 34 fatores de virulência de *Aeromonas spp.* foram identificados nos 64 genomas estudados. Os fatores de virulência foram classificados quanto a sua função na patogênese bacteriana e estão distribuídos na Tabela 4. Foram identificados fatores relacionados a aderência e motilidade (fímbria tipo I, *pili* TAP e FLP tipo IV, *pili* hemaglutinina sensível à manose (MSH), flagelo polar e lateral, homólogo do fator acessório de colonização identificado em *Vibrio*, homólogo da porção O-antígeno do LPS identificado em *Pseudomonas* e *Yersinia* e homólogo de fímbrias de *Escherichia*); sistemas de secreção (T2SS, T3SS, T6SS, homólogo de TTSS de *Pseudomonas* e homólogo de

EPS de *Vibrio*); toxinas (aerolisinas, enterotoxina citotônica, hemolisina III, hylA, AHH1 e termoestável, toxina do tipo RTX, homólogo da exotoxina A de *Pseudomonas*, homólogo de LOS identificado de *Haemophilus* e homólogo do LPS de *Pseudomonas*); evasão do sistema imune (homólogo de cápsula de *Acinetobacter*), sistema de glicosilação (homólogo do sistema responsável pela glicosilação flagelar de *Campylobacter*), respiração anaeróbica (homólogo da nitrato redutase identificada em *Mycobacterium*); resistência ácida (homólogo da urease identificada em *Helicobacter*); resistência ao estresse oxidativo (homólogo da catalase peroxidase de *Mycobacterium*); e aquisição e captação de ferro (homólogos de sideróforos identificados em *Acinetobacter*, *Brucella*, *Klebsiella* e *Shigella*).

Alguns fatores de virulência, foram identificados pela presença de conjunto de genes envolvidos na sua biossíntese. Assim, todos os fatores de virulência relacionados com a adesão e motilidade bacteriana foram identificados dessa maneira. Por exemplo, a *pili* tipo IV FLP, relacionada com a formação de biofilme e o processo de aglutinação, foi identificada pela presença de 13 genes (*flp1*, *flpABCDEFGHIJKL*). De forma similar, foram identificados: o flagelo lateral, relacionado com a motilidade sob superfícies sólidas e como acessório facilitador para a formação de biofilme (*flgCEIJFGP*, *lafBCEFKSTUX*, *lfgABFGHKLMN*, *lfhABEHJLMNQR*, *maf-5*); flagelo polar, envolvido com a mobilidade em superfícies líquidas e essencial para a colonização intestinal (*cheA-2*, *cheB-2*, *cheR-3*, *cheVWXYZ*, *flaABGHJ*, *flgABCDEFGHIJKLMN*, *flhABFG*, *fliAEFGHIJKLMNOPQR*, *flmDH*, *flrABC*, *maf-1*, *maf-2*, *motXY*, *nueAB*, *pomA2*, *pomA*, *pomB2*, *pomB*); *pili* MSH, relacionada com a aderência e colonização bacteriana ao tecido do hospedeiro (*mshABCDEFGHIJKLMNO*); *pili* TAP do tipo IV (*tapABCDEFGHIJKLMNO*, *tapY1*, *tapY2*, *tppABCDEF*) e fímbria, também envolvida nos estágios iniciais da colonização ao tecido hospedeiro (*fimABCDEF*).

Os conjuntos de genes relacionados à biossíntese dos sistemas de secreção também foram pesquisados. Sendo assim, foram identificados: o sistema de secreção T2SS, relacionado com a secreção de aerolisinas, citotoxinas, hemolisinas, DNases, lipases e proteases (*exeABCDEFGHIJKLMN*, *tapD*); sistema de secreção T3SS, identificado como injetossomo responsável pela secreção de fatores de virulência diretamente no citoplasma de célula alvo; (*acr1*, *acr2*, *acrGHRV*, *aexT*, *aopBDHNOX*, *ascABCDEFGHIJKLMNO*, *ati1*, *ati2*, *exsABCDE*,

sycHOX); sistema de secreção T6SS, identificado também como aparelho injetável do tipo *phagetail-spike* e responsável pela translocação de fatores de virulência diretamente no citoplasma da célula hospedeira (*atsABCDEFGHIJKLMNOPS*, *clpV1*, *dot*, *hcp1*, *hcp*, *vasH* *vasK/atsR*, *vgrG1* *vgrG2*, *vgrG3*, *vipA*, *vipB*) e a toxina do tipo RTX, relacionado com a atividade citotóxica (*rtxABCDEFH*).

Os outros fatores de virulência foram identificados a partir da presença de genes específicos relacionados com a sua biossíntese. A exemplo o O-antígeno (*Pseudomonas*) e (*Yersinia*), subunidade que compõe a estrutura do LPS, responsável pela produção de uma resposta inflamatória não específica, que foram identificados, respectivamente, pela presença dos genes (*wbpE* e *orfM*) e (*manB*, *cpsB*, *wcaG1* e *ddhA*). De forma similar foram identificados os outros fatores de virulência como fator acessório de colonização (*acfC*) desempenhando um papel de quimiotaxia e facilitando o processo de colonização intestinal; homólogo do sistema de secreção TTSS de *Pseudomonas* (*exoU*) relacionado com o transporte de proteínas efetora; aerolisina/enterotoxina citotóxica (*aerA/act*), relacionada com as atividades hemolíticas, citotóxicas e enterotoxinas; hemolisina extracelular (*ahh1*), hemolisina (*hlyA*), envolvidas com a atividade hemolítica; enterotoxina termoestável (*ast*), relacionada com a atividade enterotóxica; homólogo da exotoxina-A de *Pseudomonas* (*toxA*), homólogo da urease de *Helicobacter* (*ureB*), envolvida com mecanismos de resistência ácida; homólogo da nitrato redutase de *Mycobacterium* (*narH*) envolvida com a respiração anaeróbica; polissacarídeo capsular (*wecA*, *wbfU*, *wbfY*, *wbjD/wecB*) componente relacionado com a biossíntese da cápsula; LOS (*kpsF*) e LPS (*bplA*), relacionados com a estimulação da resposta inflamatória, sistema de glicosilação homólogo ao de *Campylobacter* (*neuB2*), enterobactin (*entA* *entB* e *entE*), acinetobactin (*basG*) envolvidos com a aquisição de ferro e o homólogo da catalase-peroxidase de *Mycobacterium* (*katG*) envolvida na adaptação ao estresse oxidativo.

Tabela 4. Fatores de virulência identificados nos isolados de SBU.

Classe dos fatores de virulência	Fator de virulência	Gene envolvido na sua biossíntese
Aderência e motilidade	<i>pili</i> tipo IV FLP	<i>flp1, flpABCDEFGHIJKL</i>
	<i>pili</i> TAP do tipo IV	<i>tapABCDEFGHIJKLMNQRSTUUVW, tapY1, tapY2, tppABCDEF</i>
	<i>pili</i> MSH	<i>mshABCDEFGHIJKLMNO PQ</i>
	Flagelo lateral	<i>flgCEIJFGP, lafBCEFKSTUX, lfgABFGHKLMN, lfhABEHJLMNQR, maf-5</i>
	Flagelo polar	<i>cheA-2, cheB-2, cheR-3, cheVWYZ, flaABGHJ, flgABCDEFGHIJKLMN, flhABFG, fliAEFGHIJKLMNQRSTU, flmDH, flrABC, maf-1, maf-2, motXY, nueAB, pomA2, pomA, pomB2, pomB</i>
	Fímbria	<i>fimABCDEF</i>
	Homólogo do LPS O-antígeno de <i>Pseudomonas</i>	<i>wbpE e orfM</i>
Sistema de secreção	T2SS	<i>exeABCDEFGHIJKLMN, tapD</i>
	T3SS	<i>acr1, acr2, acrGHRV, aexT, aopBDHNOX, ascABCDEFGHIJKLMNQRSTUUVWY, ati1, ati2, exsABCDE, sycHOX</i>
	T6SS	<i>atsABCDEFGHIJKLMNQRSTU, clpV1, dot, hcp1, hcp, vasH vasK/atsR, vgrG1 vgrG2, vgrG3, vipA, vipB</i>
	Homólogo de TTSS de <i>Pseudomonas</i>	<i>exoU</i>
Toxinas	Aerolisina/enterotoxina citotóxica	<i>aerA/act</i>
	Hemolisina extracelular	<i>ahh1</i>
	Hemolisina	<i>hlyA</i>
	Enterotoxina termoestável	<i>ast</i>
	Homólogo da exotoxina-A de <i>Pseudomonas</i>	<i>toxA</i>
	Toxina do tipo RTX	<i>rtxABCDEFH</i>
Resistência ácida	Homólogo da urease de <i>Helicobacter</i>	<i>ureB</i>
Respiração anaeróbica	Homólogo da nitrato redutase de <i>Mycobacterium</i>	<i>narH</i>
Evasão do sistema imune	Polissacarídeo capsular	<i>wecA, wbfU, wbfY, wbjD/wecB</i>

Classe dos fatores de virulência	Fator de virulência	Gene envolvido na sua biossíntese
Endotoxinas	LOS	<i>kpsF</i>
	LPS	<i>bplA</i>
Sistema de glicosilação	Sistema de glicosilação homólogo ao de <i>Campylobacter</i>	<i>neuB2</i>
Aquisição e absorção de ferro	Sideróforos	<i>entABE</i> e <i>basG</i>
Adaptação ao estresse	Homólogo da catalase-peroxidase de <i>Mycobacterium</i>	<i>katG</i>

Fonte: autor

5.3 DISTRIBUIÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA ENTRE OS GENOMAS DE *AEROMONAS* ESTUDADOS

A distribuição dos fatores de virulência nos isolados de *Aeromonas* spp. foi expressa em frequências relativas e apresentadas no Quadro 5. O conjunto composto pela presença das *pilI*'s TAP tipo IV e MSH, flagelo polar, sistema de secreção do tipo 2 (T2SS) foi identificada em todos os genomas deste estudo e foram definidos como *core* de fatores de virulência. Logo em seguida, estão os sistema de secreção do tipo 6 (T6SS) presente em 87,34%, hemolisina *hlyA* presente em 86,07%, hemolisina do tipo III e hemolisina termoestável presente em 83,54% e por fim, a fímbria presente em 62,02% dos genomas analisados. Estudos de Dahanayake *et al.*, (2019) também obtiveram resultados similares, quando analisaram a prevalência de genes com a virulência em 32 espécies de *Aeromonas* isoladas de frutos do mar (*Tegillarca granosa*), sendo os genes de virulência mais distribuídos dentre os isolados do estudo *hlyA* (72%) e *flaA* (66%), que são relacionados, respectivamente, com a biossíntese de hemolisinas e flagelo polar (Dahanayake *et al.*, 2019).

A distribuição dos fatores de virulência foi similar entre o grupo de isolados oriundos de SBU e os genomas de referência. Nos genomas dos isolados de SBU *core* de fatores de virulência está presentes em todos os genomas. Enquanto o T6SS e cápsula, que estavam presentes em 85,71% dos genomas, se ausentaram apenas em no isolado ambiental Aer593 e no isolado clínico Aer283, respectivamente. Logo em seguida estão a hemolisina do tipo III e o homólogo do O-antígeno de *Yersinia* identificado em, respetivamente 71,42% e 66,66% dos genomas.

Os isolados foram classificados de acordo com seu potencial virulento levando em consideração a identificação dos fatores de virulência como exposto no Quadro 6. Os resultados reforçam estudos de que reconhecem as espécies de *A. dharkensis* e *A. hydrophilla* como as mais virulentas dentro do gênero. O isolado *A. australiensis* Aer294, foi o que abrigou a maior quantidade de fatores de virulência por conta disso foi classificado como o maior potencial virulento, quando comparado com os outros 64 genomas estudados, sendo identificado um conjunto de 24 fatores de virulência que incluem, além do *core* a: pili tipo IV FLP e laterais, fímbria, O-antígeno (*Pseudomonas*) e (*Yersinia*), sistema de secreção T3SS e T6SS, aerolisina/enterotoxina citotóxica, hemolisina, hemolisina extracelular, hemolisina III, LOS, LPS, homólogo da nitrato redutase de *Mycobacterium*, polissacarídeo capsular de *Vibrio*, glicosilação flagelar ligada ao O, cápsula, exopolissacarídeo e sideróforo). Seguida pelos isolados *A. hydrophilla* Aer284, *A. jandaei* Aer337 e *A. trota* Aer371 apresentando um conjunto de, respectivamente, 16, 14 e 12 fatores de virulência, sendo comum entre eles, além do *core* o flagelo lateral, sistema de secreção T6SS e cápsula.

Os isolados *A. dharkensis* Aer283 e *A. caviae* Aer268 mostraram-se com potencial virulento mediano, com a identificação de 10 fatores de virulência, sendo encontrados apenas o *core* como fatores de virulência coexistindo nos dois genomas. Por fim, isolado *A. caviae* Aer593 também apresentou modesto potencial dentre os isolados, foram identificados 7 fatores de virulência: o *core* de fatores de virulência, hemolisina hylA, hemolisina III, hemolisina termoestável, cápsula, LPS e o homólogo da catalase-peroxidase de *Mycobacterium*.

De maneira geral, os fatores de virulência identificados entre os isolados de SBU foram comumente distribuídos entre os outros genomas estudados. Todos os genomas apresentaram fatores de virulência relacionados a aderência e motilidade bacteriana, sistemas de secreção e produção de toxinas, incluindo genomas de isolados de diferentes sítios de isolamento, indicando a virulência de *Aeromonas* tenha um caráter multifatorial.

Esses dados corroboram estudos anteriores (Chen *et al.*, 2013) que observou elevado potencial virulento em espécies de *Aeromonas*, que segundo os autores é resultado da presença dos genes *ahh1*, *aerA* e *ascV* codificadores de fatores relacionados à atividade hemolítica, citotóxica e secreção de toxinas pelo sistema de secreção T6SS, refletindo em moderada toxicidade em ensaios de patogenicidade

com *Caenorhabditis elegans*, atividade citotóxica em cultura celular e taxa de morte em ratos (Chen *et al.*, 2013). Neste estudo, os isolados de *A. australiensis* Aer294 e *A. hydrophila* Aer284, abrigam os genes *ahh1*, *aerA* e *ascV*, reforçando a ideia de que estes isolados possam apresentar um potencial virulento elevado.

Tabela 5. Genomas utilizados neste estudo.

Espécie	Cepa	Status do genoma	Número de acesso	Localização geográfica	Origem	Ano do isolamento
<i>Aeromonas australiensis</i>	Aer294	WGS	GCA_021538905.1	Brasil	Fezes	2004
<i>Aeromonas bestiarum</i>	GA97-22	WGS	GCA_002906925.1	EUA	Peixe	1997
<i>Aeromonas caviae</i>	L12	WGS	GCA_000813475.1	Malásia	Matrizes aquáticas	2014
<i>Aeromonas caviae</i>	1605-27183	Complete	GCA_013488005.1	Ásia	Líquido cefalorraquidiano	2016
<i>Aeromonas caviae</i>	429865	WGS	GCF_001270765.1	México	Urina	2013
<i>Aeromonas caviae</i>	Aer268	WGS	GCA_003857325.1	Brasil	Fezes	2004
<i>Aeromonas caviae</i>	Aer593	WGS	GCA_003849745.1	Brasil	Matrizes aquáticas	2004
<i>Aeromonas caviae</i>	BVH84	WGS	GCA_009906375.1	n	Fezes	n
<i>Aeromonas caviae</i>	BVH98	WGS	GCA_009905865.1	n	Ferida	n
<i>Aeromonas caviae</i>	FDAARGOS 75	Complete	GCF_000783715.1	EUA	Fezes	2013
<i>Aeromonas caviae</i>	GEO_37_Down_A	WGS	GCA_004024185.1	EUA	Matrizes aquáticas	2017
<i>Aeromonas caviae</i>	GSH8M-1	Complete	GCA_003925855.1	Japão	Matrizes aquáticas	2018
<i>Aeromonas caviae</i>	K433	Complete	GCA_020181575.1	China	Escarro	2020
<i>Aeromonas caviae</i>	YL12	WGS	GCF_000721855.1	Malásia	Solo	2014
<i>Aeromonas dhakensis</i>	15996	WGS	GCA_017582505.1	Nigéria	Urina	2018
<i>Aeromonas dhakensis</i>	16006	WGS	GCA_017582425.1	Nigéria	Urina	2018
<i>Aeromonas dhakensis</i>	17FW001	WGS	GCA_003432465.1	China	Sangue	2017
<i>Aeromonas dhakensis</i>	AE-13	WGS	GCA_003723975.1	Austrália	Sangue	2013
<i>Aeromonas dhakensis</i>	Aer283	WGS	GCA_003849805.1	Brasil	Fezes	2004
<i>Aeromonas dhakensis</i>	BVH43	WGS	GCA_006246155.1	n	Ferida	n
<i>Aeromonas dhakensis</i>	BVH65	WGS	GCA_006226215.1	n	Sangue	n
<i>Aeromonas dhakensis</i>	Cr2	WGS	GCA_002734165.1	Cingapura	Matrizes aquáticas	2014
<i>Aeromonas dhakensis</i>	SSU	WGS	GCA_000708085.1	Filipinas	Fezes	1985
<i>Aeromonas dhakensis</i>	A2-155	WGS	GCA_000315195.1	Taiwan	Sangue	n
<i>Aeromonas diversa</i>	2478-85	WGS	GCA_000367845.1	EUA	Ferida	1985
<i>Aeromonas trota</i>	1999lcr	WGS	GCA_000687355.1	USA	Líquido cefalorraquidiano	1999
<i>Aeromonas trota</i>	Aer371	WGS	GCA_003849645.1	Brasil	Fezes	2004
<i>Aeromonas hydrophila</i>	14	WGS	GCA_000354655.1	Malásia	Líquido peritoneal	2013
<i>Aeromonas hydrophila</i>	173	WGS	GCA_000354675.1	Malásia	Líquido peritoneal	n

Espécie	Cepa	Status do genoma	Número de acesso	Localização geográfica	Origem	Ano do isolamento
<i>Aeromonas hydrophila</i>	187	WGS	GCA_000354635.1	Malásia	Ferida	2013
<i>Aeromonas hydrophila</i>	226	WGS	GCA_000586055.1	Malásia	Urina	1983
<i>Aeromonas hydrophila</i>	259	WGS	GCA_000354695.1	Malásia	Sangue	2012
<i>Aeromonas hydrophila</i>	277	WGS	GCA_000354715.1	Malásia	Ferida	n
<i>Aeromonas hydrophila</i>	HZM	WGS	GCA_000701085.1	Malásia	Solo	2013
<i>Aeromonas hydrophila</i>	L14f	WGS	GCA_000813465.1	Malásia	Matrizes aquáticas	2014
<i>Aeromonas hydrophila</i>	M013	WGS	GCA_000783255.1	Malásia	Matrizes aquáticas	2013
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ML09-119	Complete	GCA_000401555.1	USA	Peixe	2009
<i>Aeromonas hydrophila</i>	pc104A	Complete	GCA_000635955.1	USA	Solo	2010
<i>Aeromonas hydrophila</i>	71317	Complete	GCA_020405385.1	China	Sangue	2020
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ae25	WGS	GCA_002897335.1	Sri Lanka	Peixe	2007
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ae34	WGS	GCF_000698205.1	Sri Lanka	Peixe	2008
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aer284	WGS	GCA_003849735.1	Brasil	Fezes	2004
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ah-HSP	WGS	GCF_001982465.1	Brasil	Sangue	2007
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AH1		GCA_002834265.1	USA	Ferida	2013
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AL97-91	WGS	GCF_001705905.1	USA	Peixe	1997
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Arkansas 2010	WGS	GCF_001705945.1	USA	Peixe	2010
<i>Aeromonas hydrophila</i>	B-1	WGS	GCA_014396965.1	USA	Abscesso	2019
<i>Aeromonas hydrophila</i>	D4	Complete	GCF_001518775.1	China	Peixe	2012
<i>Aeromonas hydrophila</i>	FDAARGOS 78	WGS	GCA_000783635.1	USA	Fezes	2013
<i>Aeromonas hydrophila</i>	MN98-04	WGS	GCF_001705915.1	USA	Peixe	1997
<i>Aeromonas hydrophila</i>	OnP3.1	Complete	GCA_017310215.1	Brasil	Matrizes aquáticas	2010
<i>Aeromonas hydrophila</i>	RB-AH	WGS	GCF_000724965.1	Malásia	Solo	2012
<i>Aeromonas hydrophila</i>	RIMD111065	Complete	GCA_016592295.1	Japão	Sangue	2015
<i>Aeromonas hydrophila</i>	TPS-30	WGS	GCA_002115515.1	China	Peixe	1990
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ZYAH75	Complete	GCA_003491245.1	China	Ferida	2015
<i>Aeromonas hydrophila</i>	YL17	Complete	GCA_000612075.1	Malásia	Solo	2014
<i>Aeromonas jandaei</i>	L14h	WGS	GCA_000813485.1	Malásia	Matrizes aquáticas	2014
<i>Aeromonas jandaei</i>	Riv2	WGS	GCA_000708125.1	EUA	Matrizes aquáticas	2012
<i>Aeromonas jandaei</i>	Aer337	WGS	GCA_003849685.1	Brasil	Fezes	2004

Espécie	Cepa	Status do genoma	Número de acesso	Localização geográfica	Origem	Ano do isolamento
<i>Aeromonas salmonicida</i>	34mel	Complete	GCA_002735225.1	Argentina	Matrizes aquáticas	2017
<i>Aeromonas schubertii</i>	ATCC 43700	WGS	GCF_001481395.1	EUA	Abscesso	1981
<i>Aeromonas taiwanensis</i>	198	WGS	GCA_004524025.1	China	Matrizes aquáticas	2015
<i>Aeromonas veronii</i>	126-14	WGS	GCA_002900255.1	China	Fezes	2017
<i>Aeromonas veronii</i>	312M	WGS	GCA_003859745.1	Brasil	Fezes	2007
<i>Aeromonas veronii</i>	A29	WGS	GCA_002214865.1	África do Sul	Matrizes aquáticas	2011
<i>Aeromonas veronii</i>	AK227	WGS	GCA_006246555.1	França	Matrizes aquáticas	2019
<i>Aeromonas veronii</i>	AK247	WGS	GCA_006246495.1	n	Abscesso	2019
<i>Aeromonas veronii</i>	BVH37	WGS	GCA_006246175.1	n	Sangue	2019
<i>Aeromonas veronii</i>	BVH46	WGS	GCA_006246165.1	n	Sangue	2019
<i>Aeromonas veronii</i>	BVH47	WGS	GCA_006246355.1	n	Sangue	2019
<i>Aeromonas veronii</i>	CCM 4359	WGS	GCF_001908535.1	EUA	Escarro	1988
<i>Aeromonas veronii</i>	CCM 7244	WGS	GCF_001908555.1	Alemanha	Matrizes aquáticas	1991
<i>Aeromonas veronii</i>	D	WGS	GCA_008802305.1	África do Sul	Matrizes aquáticas	2017
<i>Aeromonas veronii</i>	KL7	WGS	GCA_901212345.1	Reino Unido	Matrizes aquáticas	2019
<i>Aeromonas veronii</i>	KL8	WGS	GCA_901212395.1	Reino Unido	Matrizes aquáticas	2019
<i>Aeromonas veronii</i>	KL9	WGS	GCA_901212405.1	Reino Unido	Matrizes aquáticas	2019
<i>Aeromonas veronii</i>	SW3814	Complete	GCA_020172765.1	EUA	Matrizes aquáticas	2015
<i>Aeromonas veronii</i>	VBF557	WGS	GCA_001696435.1	India	Fezes	2015

Legenda: Em vermelho os genomas das cepas de SBU. n: informação não identificada nos bancos de dados.

Fonte: autor

Tabela 6. Distribuição dos fatores de virulência entre os genomas estudados

Espécie	Cepa	N. de genes de virulência	N. de fatores de virulência
<i>Aeromonas australiensis</i>	Aer294	238	24
<i>Aeromonas veronii</i>	VBF557	213	20
<i>Aeromonas dhakensis</i>	15996	220	19
<i>Aeromonas dhakensis</i>	16006	222	19
<i>Aeromonas dhakensis</i>	AE-13	222	19
<i>Aeromonas dhakensis</i>	SSU	208	19
<i>Aeromonas veronii</i>	KLG9	208	19
<i>Aeromonas veronii</i>	312M	230	19
<i>Aeromonas veronii</i>	CCM 7244	233	19
<i>Aeromonas dhakensis</i>	277	223	18
<i>Aeromonas dhakensis</i>	BVH65	217	18
<i>Aeromonas hydrophila</i>	187	229	18
<i>Aeromonas hydrophila</i>	259	223	18
<i>Aeromonas jandaei</i>	Riv2	215	18
<i>Aeromonas veronii</i>	KLG8	216	18
<i>Aeromonas dhakensis</i>	Cr2	196	17
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ae34	192	17
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AH1	166	17
<i>Aeromonas hydrophila</i>	M013	214	17
<i>Aeromonas veronii</i>	D	169	17
<i>Aeromonas hydrophila</i>	14	163	17
<i>Aeromonas bestiarum</i>	GA97-22	225	16
<i>Aeromonas caviae</i>	8LM	180	16
<i>Aeromonas dhakensis</i>	17FW001	159	16
<i>Aeromonas dhakensis</i>	BVH43	219	16
<i>Aeromonas hydrophila</i>	226	134	16
<i>Aeromonas hydrophila</i>	RIMD111065	158	16
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aer284	209	16
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ah-HSP	154	16
<i>Aeromonas veronii</i>	A29	189	16
<i>Aeromonas veronii</i>	BVH47	190	16
<i>Aeromonas hydrophila</i>	D4	165	15
<i>Aeromonas hydrophila</i>	FDAARGOS_78	125	15
<i>Aeromonas hydrophila</i>	L14f	151	15

Espécie	Cepa	N. de genes de virulência	N. de fatores de virulência
<i>Aeromonas hydrophila</i>	OnP3.1	157	15
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ZYAH75	159	15
<i>Aeromonas jandaei</i>	L14h	146	15
<i>Aeromonas veronii</i>	BVH37	219	15
<i>Aeromonas veronii</i>	SW3814	136	15
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ML09-119	143	14
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Arkansas 2010	142	14
<i>Aeromonas jandaei</i>	Aer337	87	14
<i>Aeromonas salmonicida</i>	34mel	142	14
<i>Aeromonas veronii</i>	126-14	116	14
<i>Aeromonas veronii</i>	BVH46	213	14
<i>Aeromonas aquariorum</i>	AAK1	106	13
<i>Aeromonas caviae</i>	FDAARGOS_75	173	13
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ae25	63	13
<i>Aeromonas hydrophila</i>	71317	158	13
<i>Aeromonas hydrophila</i>	TPS-30	155	13
<i>Aeromonas veronii</i>	AK227	125	13
<i>Aeromonas caviae</i>	GEO_37_Down_A	154	12
<i>Aeromonas diversa</i>	2478-85	177	12
<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	Aer371	152	12
<i>Aeromonas veronii</i>	KLG7	75	12
<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	1999lcr	151	12
<i>Aeromonas caviae</i>	429865		11
<i>Aeromonas caviae</i>	BVH84	117	11
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AL97-91	120	11
<i>Aeromonas caviae</i>	K433	118	11
<i>Aeromonas caviae</i>	YL12	155	11
<i>Aeromonas caviae</i>	GSH8M-1	119	10
<i>Aeromonas caviae</i>	Aer268	43	10
<i>Aeromonas caviae</i>	BVH98	115	10
<i>Aeromonas caviae</i>	L12	111	10
<i>Aeromonas dhakensis</i>	Aer283	55	10
<i>Aeromonas hydrophila</i>	MN98-04	116	10
<i>Aeromonas taiwanensis</i>	198	59	10
<i>Aeromonas caviae</i>	1605-27183	117	10

Espécie	Cepa	N. de genes de virulencia	N. de fatores de virulência
<i>Aeromonas dhakensis</i>	173	50	10
<i>Aeromonas caviae</i>	Aer593	110	7

Legenda: Em vermelho as

Fonte: autor

Os genes relacionados com a biossíntese de aerolisina (*aerA*), hemolisina (*hlyA*), hemolisina extracelular (*ahh1*), envolvidas com a atividade hemolítica e citotóxica de *Aeromonas* spp. foram identificados, respectivamente, em 69,62%, 86,07% e 46,83% das cepas estudadas. Os efeitos da aerolisina e hemolisina são produzidos em sinergismo quando atuam relacionado a atividade citotóxica em cultura celular (Wang et al., 2003). Os isolados *A. australiensis* Aer294 e *A. dhakensis* Aer283 abrigam os genes *aerA*, *hlyA* e *ahh1*. Em ensaios com mutantes isogênicos de *hlyA* e *aerA* inativados apresentaram diminuição da atividade citotóxica, anulação da atividade hemolítica e, por consequência, um aumento de 20 vezes na LD50 dos mutantes nulos desses genes (Wang et al., 2003), sugerindo o elevado potencial virulento destes isolados associada a atividade hemolítica e citotóxica.

Os genes *act* e *ast* relacionados, respectivamente, com as enterotoxinas citotóxica e citotônica foram identificados em 69,62% e 30,37% dos genomas deste estudo. A enterotoxina citotóxica está relacionada com a destruição das microvilosidades do epitélio intestinal e foi identificada nos isolados oriundos de SBU como *A. australiensis* Aer294, *A. dhakensis* Aer283, *A. trota* Aer371 e *A. hydrophila* Aer284. Estudos de Chopra; Houston, (1999) demonstraram por ensaios com mutantes isogênicos do gene *act* nulo, que a LD50 de *Aeromonas* em ratos apresentou um aumento quando comparada a cepas que apresentaram o gene *act*, demonstrando o seu importante papel para a virulência de *Aeromonas* spp. (Chopra; Houston., 1999). Já o gene *ast* que codifica para a enterotoxina citotônica foi encontrado apenas no isolado *A. hydrophila* Aer284. Os mesmos autores também demonstraram que houve um aumento dos níveis de cAMP e PGE2 na mucosa intestinal de ratos que foram tratados com a enterotoxina em comparação com os ratos do grupo controle. O aumento dos níveis de cAMP e PGE2 estão ligados com o aumento da secreção do epitélio intestinal, em consequência da atividade enterotóxica (Chopra; Houston., 1999).

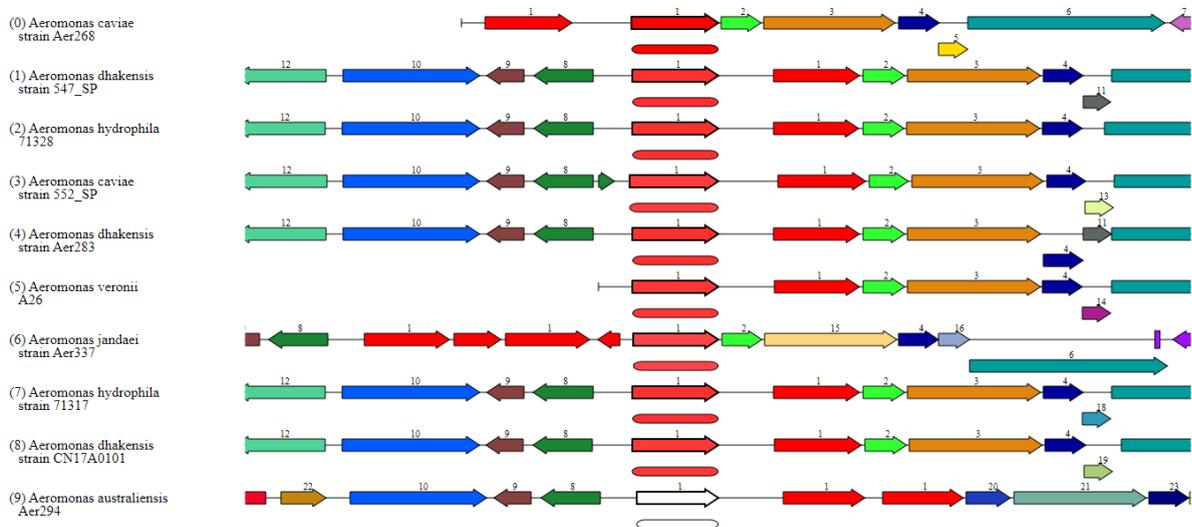
O ferro é um íon relacionado com diversas vias celulares e metabólicas, sendo de extrema importância para o crescimento bacteriano. A captação de ferro pela bactéria no organismo hospedeiro, onde o ferro disponível encontra-se ligado a proteínas carreadoras, se dá mediante a produção de sideróforos e representam um importante fator de virulência. Os genes relacionados com a biossíntese dos sideróforos enterobactin (*entABE*) foram identificados nos genomas de *A. australiensis* Ae294, *A. trota* Aer371 e *A. jandaei* Aer337. Em contrapartida, apenas o isolado *A. dhakensis* Aer283 apresentou o gene *basG* envolvido com a biossíntese do sideróforo acinetobactin. De acordo com estudos de Chen *et al.*, (2020), isolados de *Klebsiella pneumoniae* que apresentaram genes envolvidos com a biossíntese de sideróforos, quando cultivadas em meio enriquecido de ferro, aumentaram a formação de biofilme e a taxa de morte em larvas de *Galleria mellonella*, refletindo no aumento da virulência proveniente da utilização de íons ferro no metabolismo microbiano (Chen *et al.*, 2020). O aumento da disponibilidade de ferro também promoveu o aumento da formação de biofilme em outras espécies bacterianas que apresentaram mecanismos de aquisição de íons ferro como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* sugerindo que os isolados de *Aeromonas* spp. que apresentaram os genes envolvidos com a biossíntese de sideróforos apresentem-se também mais virulentos do que os outros isolados do estudo em decorrência de apresentarem mecanismos de aquisição e absorção de ferro (Chen *et al.*, 2020).

Alguns fatores de virulência foram pouco distribuídos entre as cepas deste estudo e estiveram presentes no genoma de *A. australiensis* Aer294. Os homólogos do O-antígeno de *Yersinia*, do LPS de *Pseudomonas*, do sistema de glicosilação de *Campylobacter* e da nitrato redutase de *Mycobacterium* estiveram pouco distribuídos entre os genomas deste estudo e presente em Aer294 e nos genomas de espécies filogeneticamente próximas. Esses resultados demonstram a diversidade do repertório de fatores de virulência da cepa Aer294 e abre caminhos para o entendimento dos possíveis mecanismos de virulência e fatores de virulência espécie/clado específicos para *A. australiensis*.

5.4 ANÁLISE DO CONTEXTO GENÉTICO DOS GENES DE VIRULÊNCIA

O gene *flaA* (900 pb) é responsável pela síntese da flagelina homônimas relacionadas ao flagelo polar. Os genes se apresentam em uma região conservada dos genomas de *Aeromonas* spp. estando *upstream* de *flaA* uma proteína hipotética, *tRNA 4-thiouridine synthase*, *hypothetical protein* e *UPF0126 inner membrane protein* *YadS*. O segmento *Flagellar FlaG*, *Flagellar FlaG*, *Flagellar FlaG*, está presente em todos os genomas analisados que apresentaram os genes, indicando a importância do locus do flagelo polar na evolução do gênero *Aeromonas* (Figura 3). A conservação desta região do genoma das espécies de *Aeromonas* já era esperada uma vez que o flagelo polar foi parte do *core* de fatores de virulência identificados neste estudo. Da mesma maneira os loci relacionado a biossíntese da *pili* MSH, TAP e T2SS se apresentam também se apresentaram conservados. Esses resultados demonstram a importância destes genes para a patogenicidade de *Aeromonas*.

Figura 3. Contexto genético do gene *flaA* em *Aeromonas* spp..



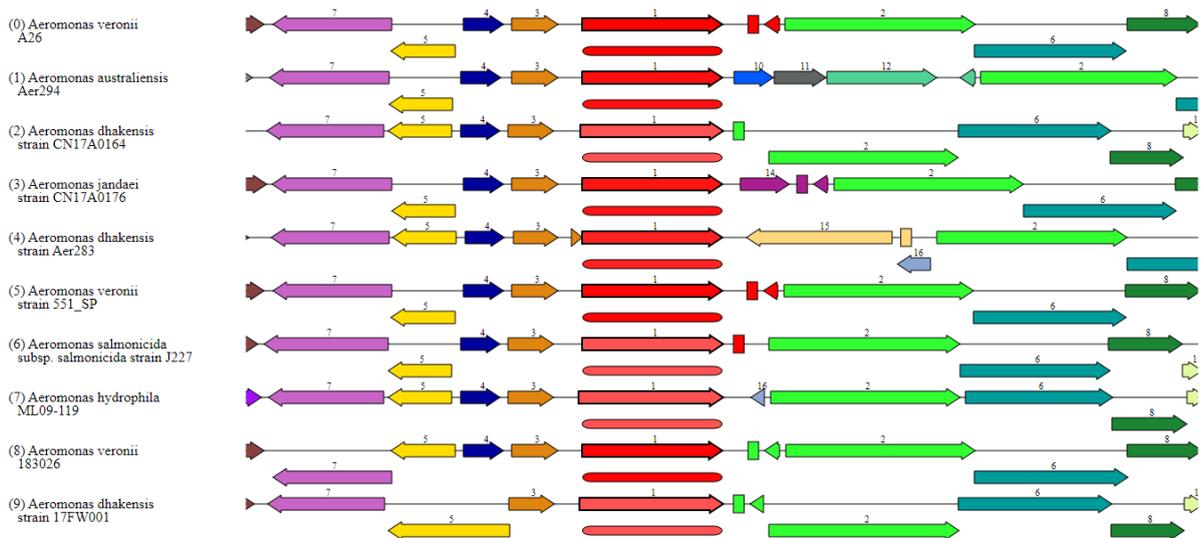
Legenda: Contexto genético altamente conservado dentro do gênero *Aeromonas* em que o gene *flaA* (seta vermelha) está sendo flanqueado *upstream* por *YadS* (seta verde escura); e *downstream* por *FlaG* (seta vermelha).

Fonte: autor.

O gene *aerA* (1467pb) codifica uma hemolisina importante para a virulência de *Aeromonas* e se apresenta numa região conservada dentro dos genomas

analisados. O segmento *two component system A/B* - proteína hipotética- proteína hipotética apresenta-se *upstream* do gene *aerA* em todas os 36 genomas incluídos neste estudo. A região *downstream* de *aerA* também é comum entre os genomas estudados sendo apresentada pelo gene *thiC* e *thiE* (Figura 4). Alguns genomas do grupo de referência como *A. veronii* A26, *A. dhakensis* CN17A0164 e *A. salmonicida* J227 apresentaram o segmento *TPP riboswitch* - proteína hipotética - *Phosphomethylpyrimidine synthase ThiC* *downstream* ao gene *aerA* e essa organização também foi verificada em Aer283, Aer284, Aer371. Já Aer294 apresentou o segmento proteína hipotética - *lipoprotein-acid--amine ligase YgiC*- proteína hipotética - *Phosphomethylpyrimidine synthase ThiC* e essa organização não foi identificada nos outros genomas do grupo de referência (Figura 4).

Figura 4. Contexto genético do gene *aerA* em *Aeromonas* spp..



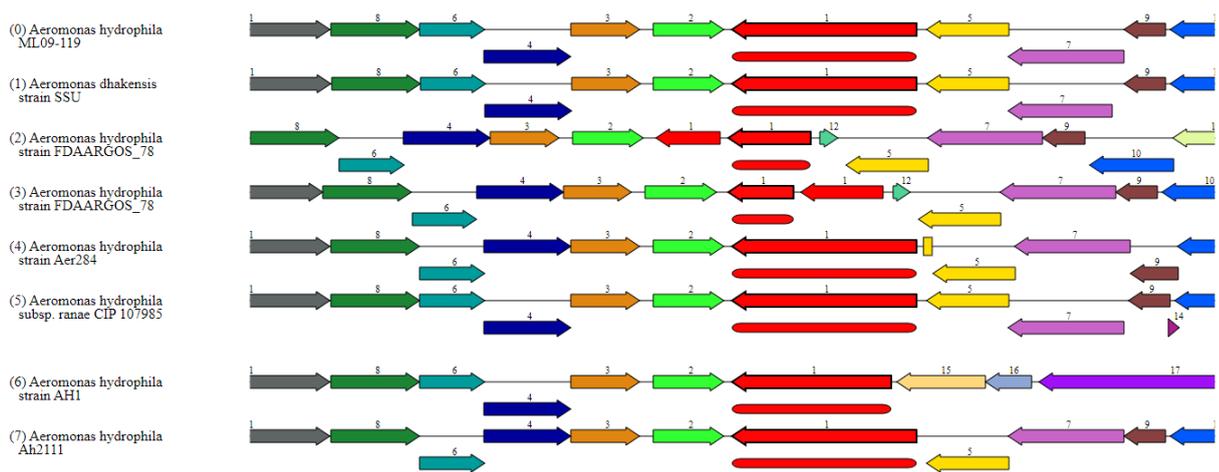
Legenda: Contexto genético altamente conservado dentro do gênero *Aeromonas* em que o gene *aerA* (seta vermelha) está sendo flanqueado *upstream* por uma proteína hipotética (seta marrom); e *downstream* por *thiC* (seta verde).

Fonte: autor

O gene *ast* (1911pb) codifica uma alpha-N-acetylgalactosaminidase e se também se apresenta numa região conservada dentro dos genomas de *Aeromonas* como apresentado na Figura 5. O segmento *Translation elongation factor LepA*, *Signal peptidase I*, *Ribonuclease III*, *GTP-binding protein*, *DNA recombination and repair protein*, *Pyridoxine 5'-phosphate synthase* estava presente *upstream* do gene *ast* em todos os 13 genomas do grupo de referência. Por outro lado, *downstream* do

gene *ast* o segmento *Tagatose 1,6-bisphosphate aldolase-N-acetylgalactosamine-6-phosphate deacetylase, N-acetylgalactosamine-specific IIA, component-N-acetylgalactosamine-specific IID* esteve presente em todos os genomas. *A. hydrophila* AH1 apresentou uma variação no contexto genético do gene *ast*, apresentando *downstream* o segmento N-acetylgalactosamine-specific IID component - protein YehS - Signal transduction histidine-protein kinase BarA. Ainda dentro do grupo de referência foram identificadas cópias do gene *ast* num mesmo locus, como por exemplo visto em *A. hydrophila* FDAARGOS_78 e *A. hydrophila* B-1. O gene *ast* apresenta-se mais distribuído entre a espécie *A. hydrophila* quando comparado a outras espécies do gênero *Aeromonas*.

Figura 5. Contexto genético do gene *ast* em *Aeromonas* spp..



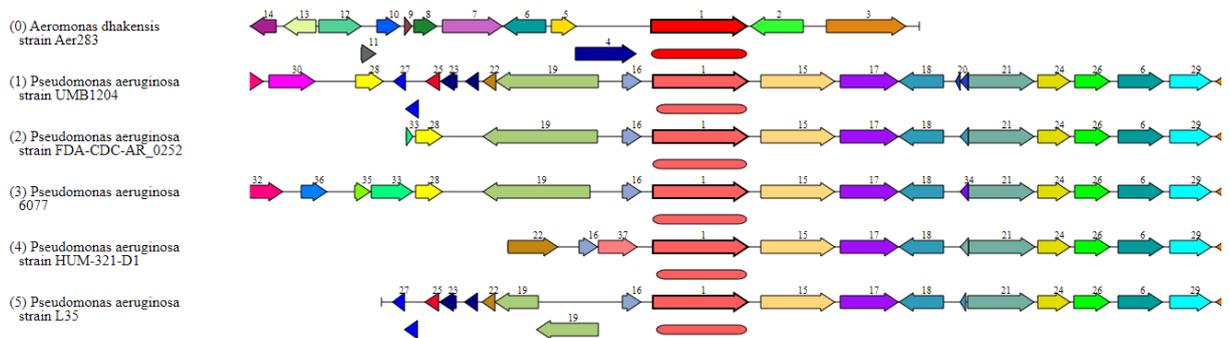
Legenda: Contexto genético altamente conservado dentro do gênero *Aeromonas* em que o gene *ast* (seta vermelha) está sendo flanqueado *upstream* por *pyridoxine 5'-phosphate synthase* (seta verde claro); e *downstream* por *Tagatose 1,6-bisphosphate aldolase-N-acetylgalactosamine-6-phosphate deacetylase- N-acetylgalactosamine-specific IIA* (seta amarela).

Fonte: autor

O gene *toxA* (1920 pb) é relacionado com a codificação da Exotoxina A, que está relacionada ao gênero *Pseudomonas* (Figura 6) e também é identificado em *Aeromonas* (Figura 7). De maneira geral, os contextos genéticos do locus do gene *toxA* em *Aeromonas* e *Pseudomonas* são diferentes e a ausência de elementos genéticos móveis envolvendo o gene *toxA* corrobora para que a sua presença em genomas nesses dois gêneros tenha uma possível origem genética distinta. A

presença de *toxA* é mais prevalente dentro de uma das espécies reconhecidamente virulentas: *A. dhakensis*, quando comparada a outras espécies.

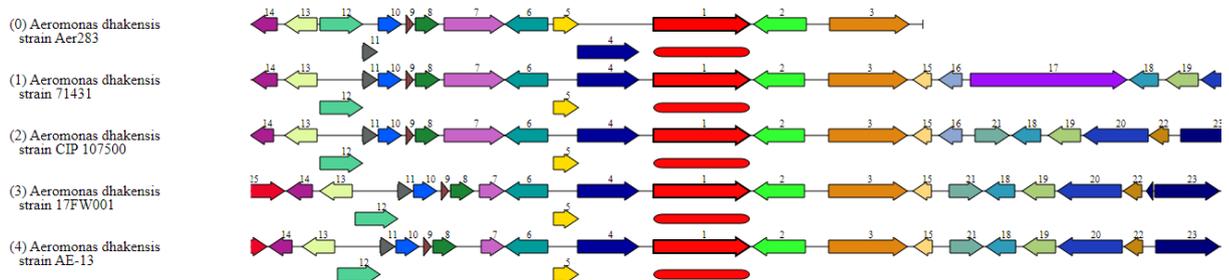
Figura 6. Contexto genético do gene *toxA* entre genomas de *Pseudomonas aeruginosa*.



Legenda: Contexto genético altamente conservado entre *Pseudomonas aeruginosa* em que o gene *toxA* (seta vermelha) está sendo flanqueado *upstream* por uma proteína hipotética (seta roxo claro); e *downstream* por GabP permease (seta amarelo claro).

Fonte: autor

Figura 7. Contexto genético do gene *toxA* entre genomas de *Aeromonas dhakensis*.



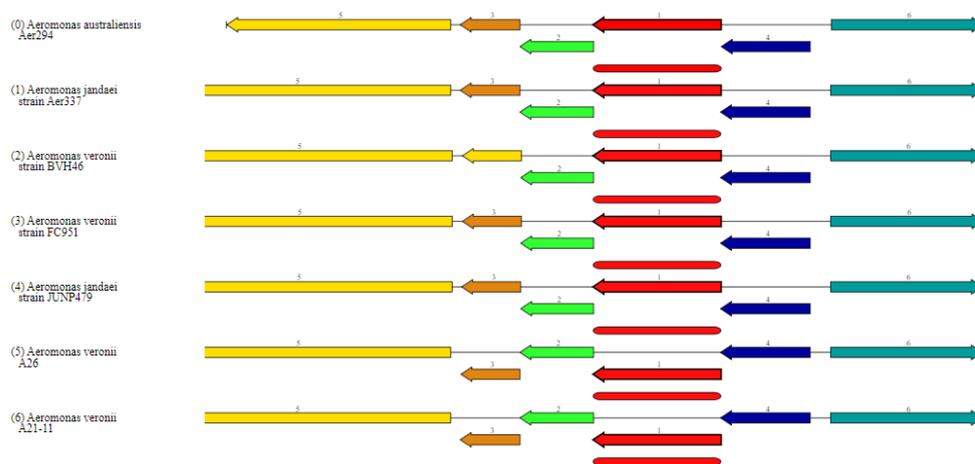
Legenda: Contexto genético altamente conservado entre *Aeromonas dhakensis* em que o gene *toxA* (seta vermelha) está sendo flanqueado *upstream* por MFS-type (seta azul escuro) e *downstream* por LSU rRNA pseudouridine(2604) sintetase (seta verde claro).

Fonte: autor.

A presença de fatores de virulência significativamente mais distribuídos entre os genomas de *A. dharkensis* e *A. hydrophilla* que são as duas espécies reconhecidamente virulentas do gênero, contextos genéticos conservados e a ausência de elementos genéticos móveis no locus pode indicar uma possível relação entre os genes *alt* e *toxA* no estabelecimento destas espécies como patógenos de importância médica.

Dois contextos genéticos em que os genes relacionados à biossíntese de sideróforos foram identificados nos genomas analisados. O primeiro é representado *entC* sendo flanqueado *upstream* por *TonB-dependent receptor* e *2-keto-3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase I alpha* e *downstream* por *3-oxoacyl reductase*, *Polyketide synthase* e *hypothetical protein* e essa organização foi identificada em Aer294 e Aer337 (Figura 8). Os genes *entC* apresentaram-se em outras organizações nos genomas de *Aeromonas*, sendo flanqueado por *upstream* por *yceB* e *hypothetical protein* e *downstream* por *Siderophore biosynthesis non-ribosomal* e *2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase* (Figura 9). Não foram identificados elementos genéticos móveis no contexto genético dos genes envolvidos na biossíntese de sideróforos, indicando as duas origens cromossômicas.

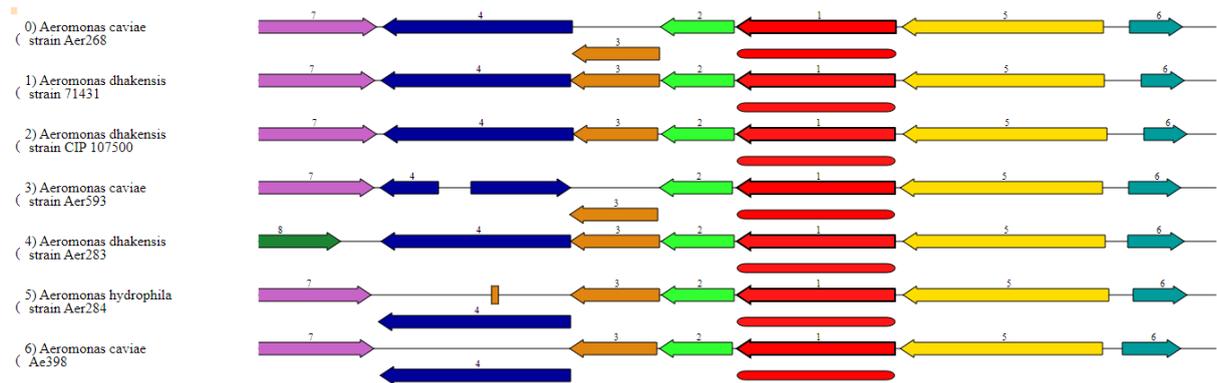
Figura 8. Contexto genético do gene *entC* entre genomas de *Aeromonas* spp..



Legenda: Contexto genético altamente conservado dentro do gênero *Aeromonas* em que o gene *entC* (seta vermelha) está sendo flanqueado *upstream* por 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase (seta verde claro) e *downstream* por uma proteína hipotética (seta azul escuro).

Fonte: autor.

Figura 9. Contexto genético do gene *entC* entre genomas de *Aeromonas* spp..

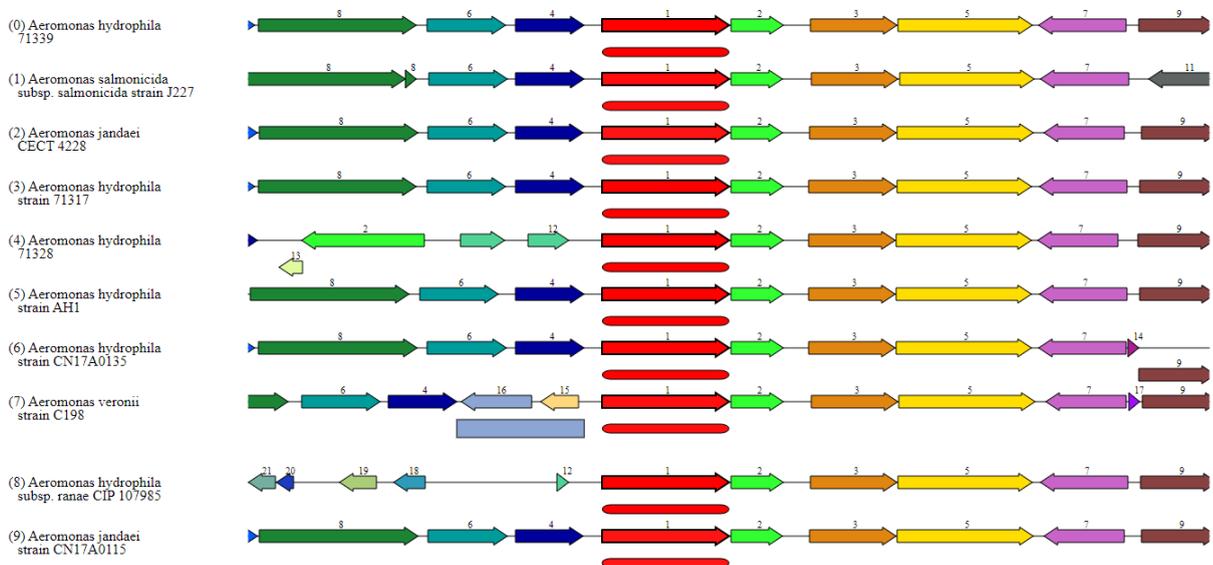


Legenda: Contexto genético altamente conservado dentro do gênero *Aeromonas* em que o gene *entC* (seta vermelha) está sendo flanqueado *upstream* por *yceB* (seta verde claro) e *downstream* por *Siderophore biosynthesis non-ribosomal* (seta amarela).

Fonte: autor.

Assim, o gene *hylA* com 1320 pb codifica uma proteína YtFL relacionada com a atividade hemolítica. O contexto genético do gene *hylA* apresenta-se numa região conservada entre os genomas do gênero *Aeromonas*. *Upstream* de *hylA* estão presente na maior parte dos genomas estudados o segmento que é composto pela *permease protein PstA*, *ATP-binding protein PstB* e *Phosphate transport system regulatory protein PhoU*. *Downstream* de *hylA* está presente o segmento composto por uma proteína hipotética, *Homocysteine S-methyltransferase*, *Arginine/ornithine antiporter* e *Fatty acid hydroxylase family* (Figura 10). Essa configuração foi identificada nos genomas de Aer268, Aer283, Aer284, Aer294, Aer337 e Aer371, que foram isolados clínicos do município de SBU. Alguns genomas do grupo referência como *A. hydrophila* 71328, CIP 107985; *A. dhakensis* F2S2-1; *A. piscicola* LMG 24783 e *A. veronii* C198 apresentaram elementos genéticos móveis como proteínas de fago e transposons, indicando uma possível fonte heteróloga destes genes e sinalizando uma importante função deste para a virulência de *Aeromonas*.

Figura 10. Contexto genético do gene *hylA* entre genomas de *Aeromonas* spp..



Legenda: Contexto genético altamente conservado dentro do gênero *Aeromonas* em que o gene *hylA* (seta vermelha) está sendo flanqueado *upstream* por PhoU (seta azul escuro) e *downstream* por uma proteína hipotética (seta verde claro).

Fonte: autor

5.5 PESQUISA *IN SILICO* DOS GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Um total de 6 genes putativos de PETN-transferase MCR-3 (*mcr-3*) 72 genes putativos de PETN-transferase MCR-7 (*mcr-7*), associados ao fenótipo de resistência à colistina em BGNs, foram identificados nos genomas estudados. Genes relacionados à produção de beta lactamases da classe A (RSA, VEB, PER, CTX-M, KPC-2 e TEM); sub-classe B1 (NDM); sub-classe B2 (*cphA2*, *cphA3*, *cphA6* e *cphA7*), da classe C (AQU-1, AQU-2, AQU-3, *imiH*, *CepS*, MOX-8, MOX-12 e MOX-13) e da classe D (OXA-726, OXA-912, OXA-504 e OXA-12) também foram encontrados. Além das betalactamases, genes relacionados à produção de bombas de efluxo, como *tet*, *sul*, *mph* e *qnr*, que estão relacionados a resistência a, respectivamente, tetraciclina, sulfonamida, macrolídeos e quinolonas.

Todos os genomas dos isolados de SBU abrigam genes putativos de PETN-transferase MCR-7 e apenas nos genomas de *A. jandaei* Aer337 e *A. caviae* Aer268 foram identificados os genes putativos de PETN-transferase MCR-3. Além desses dos genes *mcr* foram identificados genes relacionados à biossíntese de beta

lactamases da classe B da família *cphA* e da classe C pertencentes a família AQU e CepS nos genomas de *A. dhakensis* Aer283, *A. jandaei* Aer337 e *A. hydrophila* Aer284. De maneira geral todos os genomas apresentaram genes *bla*_{OXA} relacionados à biossíntese beta lactamases da classe D.

A distribuição do gene *mcr-7* entre os genomas estudados foi de 92% sendo possível a identificação de duas cópias em locus distintos em 52%, incluindo nos genomas de *A. dharkensis* Aer283, *A. hydrophila* Aer284, *A. jandaei* Aer337 e *A. trota* Aer371. O gene *mcr-3* esteve presente em 6 genomas, sendo todos eles coexistindo duas cópias e Aer337 apresentou as duas cópias num mesmo locus.

Os genes da família *bla*_{OXA} que codificam as beta-lactamases da classe D estavam amplamente distribuídos em todos os genomas analisados. A distribuição das OXA parece ser definida de acordo com a espécie, dessa forma, a OXA-726 esteve distribuída entre as espécies reconhecidamente virulentas *A. hydrophila* e *A. dharkensis*. Dessa forma, a OXA-912, OXA-504 e OXA-12 estiveram mais presentes em genomas de, respectivamente, *A. veronii*, *A. caviae* e *A. jandaei*. Esse padrão específico das OXA também foi observado entre os isolados oriundos de SBU.

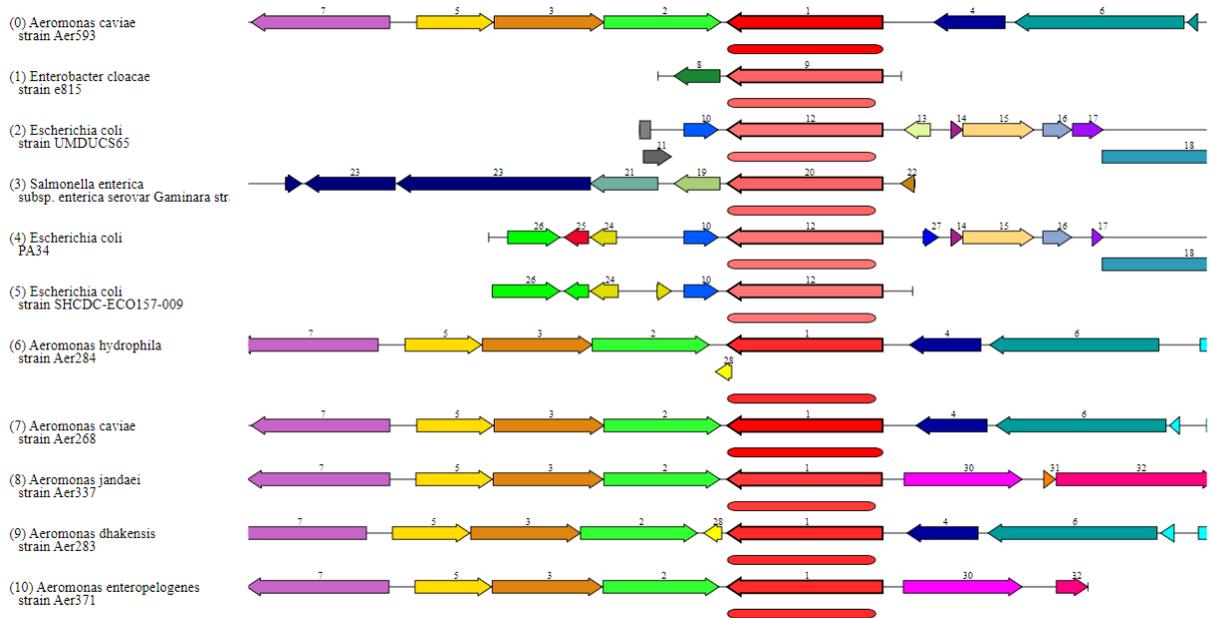
O gene *bla*_{cphA}, relacionado a codificação da uma betalactamase da subclasse B2, esteve presente em 40,00% dos genomas, se ausentando em todos os genomas da espécie *A. caviae*. Por outro lado, o gene *bla*_{MOX}, envolvido na codificação de uma betalactamase da classe C, esteve presente em 17% dos genomas do grupo de referência e em todos os genomas de *A. caviae*. Esses resultados reforçam a prevalência de genes relacionados à resistência aos beta lactâmicos em *Aeromonas* spp. e a distribuição desigual desses genes entre as espécies no gênero.

5.6 ANÁLISE DOS LOCI DOS GENES *MCR-3* E *MCR-7*

O gene *mcr-7*, que codifica uma PEtN-transferase 1617pb foi identificado em todos os genomas deste estudo, com exceção da cepa Aer294, e compartilha pelo menos 95,72% de identidade com a sequência da proteína PEtN-transferase encontrada em outros genomas de *Aeromonas* spp.. O contexto genético em que se encontra o *mcr-7* apresenta-se flanqueado *upstream* por *HD-GYP domain-containing protein* ou por *Regulatory Protein YebC* e *downstream* por *ROK family protein* apresentando-se em uma região altamente conservada entre o gênero de *Aeromonas* e em regiões com contexto genético variável em enterobactérias, como

Escherichia coli, *Enterobacter cloacae* e *Salmonella enterica* (Figura 11). A expressão constitutiva (ou indução) de PEtN-transferases pode contribuir para a redução da suscetibilidade às polimixinas em *Aeromonas spp.* e *Enterobactérias* (XU *et al.*, 2018) (KOMEDA *et al.*, 2022). Esses resultados sugerem a ocorrência natural do *mcr-7-like* em *Aeromonas spp.*

Figura 11. Contexto genético de *mcr-7-like* de *Aeromonas jandaei* Aer337



Legenda: Contexto genético altamente conservado dentro do gênero *Aeromonas* em que o gene *mcr-7-like* responsável pela codificação da PEtN-transferase (seta vermelha) está envolvido, sendo flanqueado *upstream* por HD-GYP (seta azul) e *downstream* por ROK (seta verde).

Fonte: autor.

A MCR-7 de Aer337 apresenta 96.87% de identidade com a variante eptAv 7,2 identificada no genoma de *A. jandaei* JUNP478 e outras proteínas homólogas de cepas de *A. jandaei* que foram agrupadas no mesmo clado da árvore filogenética como a enzima MCR-7.1 (Figura 15). No entanto, MCR-7 e as outras PEtN-transferase semelhantes MCR-7 deste estudo e identificadas nos genomas públicos de espécies de *Aeromonas* não apresentam o gene *dgkA* a jusante de *mcr-7.1*, como identificado, por exemplo, no plasmídeo pSC20141012 em *K.pneumoniae* (YANG *et al.*, 2018) e nas cepas UMDUCS65, PA34 e SHCDC-ECO157-009 de *E. coli* sugerindo uma provavelmente uma fonte genética

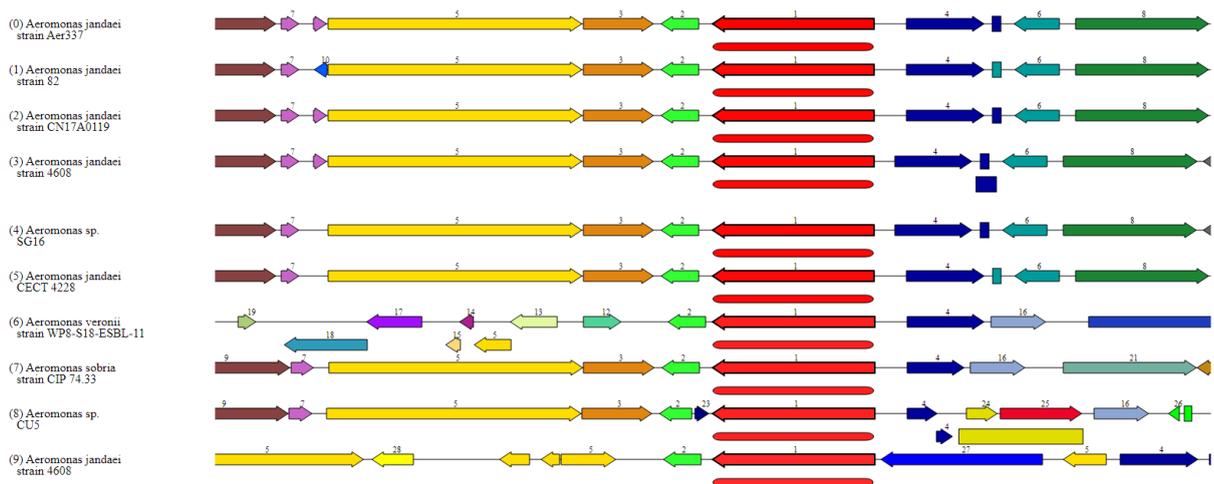
heteróloga dessas duas proteínas.

A presença do gene *dgkA* parece ser fundamental para a expressão do fenótipo de resistência à polimixina mediada por genes *mcr* em Enterobactérias 24, essa co-ocorrência parece não ser necessária para esse fenótipo mediante *mcr-7* compartilhada entre espécies de *Aeromonas spp.*, uma vez que etpAv 7,2, que não se apresenta a jusante de *dgkA*, de *Aeromonas jandaei* JUNP478 quando foi clonada em *Aeromonas hydrophila* foi capaz de conferir resistência a polimixina (KOMEDA *et al.*, 2022).

Especula-se que o MCR-7 pode ter se originado em espécies de *Aeromonas*, uma vez que compartilha pelo menos 70% de semelhança com as proteínas MCR de *Aeromonas spp.* (YANG *et al.*, 2018) de ocorrência natural e esses resultados justificam a possível transferência horizontal de *mcr-7* dentro do gênero *Aeromonas* possibilitar a expressão do fenótipo de resistência à polimixina na ausência do gene *dgka*.

Um segundo gene que codifica uma PEtN-transferase, *mcr-3-like-c* apresenta um contexto genético que apresenta-se flanqueado por um gene putativo para Rhomboid family protein e pelo gene homólogo a *dgkA* (Figura 12). O segmento dos genes *mcr-3-like-c* e *dgkA* de Aer337 foi muito semelhante ao encontrado em outros genomas de *A. jandaei* e várias outras espécies de *Aeromonas*. Como mencionado acima, o gene *dgkA* também é identificado a jusante *mcr-7.1*, e *mcr-3* transportado por plasmídeos em cepas de espécies da família *Enterobacteriaceae* resistentes à colistina (YANG *et al.*, 2017), sugerindo uma origem comum para esses genes. A proteína EHZ47_02975 foi mais relacionada aos membros da família MCR-3 de acordo com a topologia de árvore filogenética, onde se agrupou com proteínas MCR que também ocorrem com o gene *dgkA* flanqueando a jusante (Figura 15). No entanto, nenhum elemento genético móvel pôde ser identificado nas proximidades deste locus do genoma Aer337.

Figura 12. Contexto genético de *mcr-3-like-c* de *Aeromonas jandaei* Aer337.

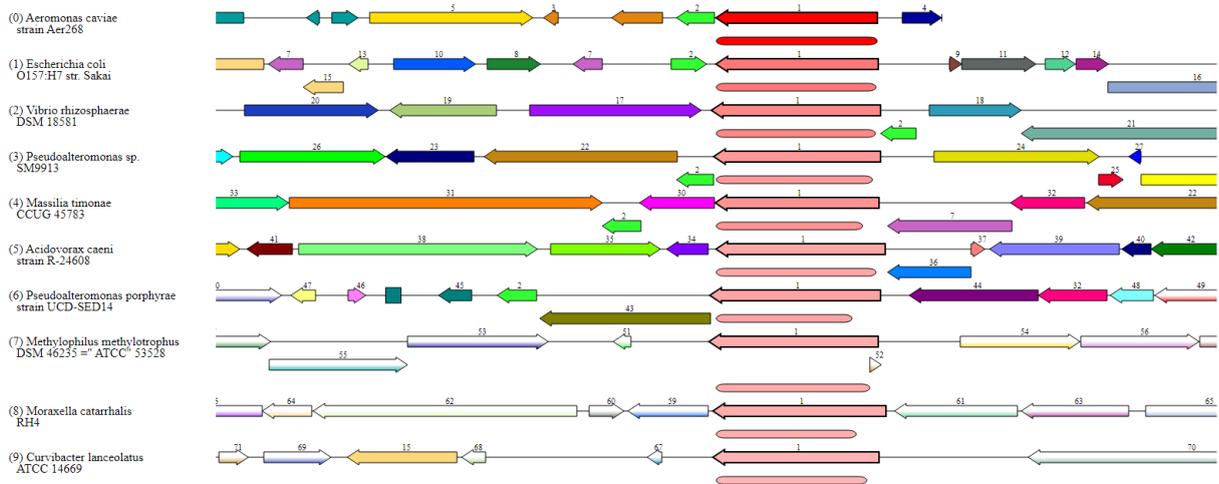


Legenda: Contexto genético altamente conservado dentro da espécie *A. jandae* em que o gene *mcr-3-like-c* responsável pela codificação da PEtN-transferase (seta vermelha) é flanqueado *upstream* por DGKA (seta verde) e *downstream* por Rhomboid family protein (seta azul).

Fonte: autor

Em contrapartida, a cepa Aer268 também apresentou um gene que codifica uma PEtN-transferase, *mcr-3.6*, que se apresenta num contexto genético variável dentro do gênero *Aeromonas* e também entre espécies da família enterobacteriaceae. O segmento *dgkA-mcr-3.6* se apresenta próximo a elementos genéticos móveis como, por exemplo, uma Sequência de Inserção (do ingles *Insertion Sequence IS*) IS5, uma transposase IS_{Ppu15} (Figura 13). O segmento *dgkA-mcr-3.6* foi semelhante aos encontrados em outros genomas de BGNs, como a *Escherichia coli* O157:H7 str. Sakai, *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. A presença de elementos genéticos móveis e a semelhança entre o segmento *dgkA-mcr-3.6* de Aer268 e outros BGNs reforça a hipótese que essas PEtN-transferase tenham origem homólogas e Aer268 atuando como possível reservatório de *mcr-3.6-like*.

Figura 13. Contexto genético de *mcr-3.6* de *Aeromonas caviae* Aer268



Legenda: Contexto genético do gene *mcr-3.6* de Aer268 responsável pela codificação da PEtN-transferase (seta vermelha) é flanqueado *upstream* por DGKA (seta verde) e *downstream* por IS5 (seta azul).

Fonte: autor

O gene *dgkA* codifica para uma diacilglicerol quinase (DGK) pertence a uma família de enzimas que converte diacilglicerol (DAG) em ácido fosfatídico (PA). A enzima DGK desempenha um papel importante na reciclagem do subproduto do DAG durante a biossíntese dessas moléculas. Vale ressaltar que as enzimas MCR catalisam a adição de PEtN ao lipídio A resultando nos produtos finais de ambos PEtN-lipídio A e DAG modificados. Além disso, *dgkA* é ativado pelo regulador da expressão gênica *BasR* de dois componentes que regula a modificação de LPS de *E. coli*, e também está ligado à função de reciclagem de fosfolipídios em outros BGNs (WAHL *et al.*, 2011). O gene *dgkA* pode ser encontrado a jusante do genes putativo de PEtN-transferase em genomas de algumas espécies de *Photobacterium* e *Vibrio tubiashii*, habitantes aquáticos da família Vibrionaceae. O *dgkA* de Aer268 e Aer377 compartilha alta identidade de sequência de nucleotídeos (até 98%) com o gene a jusante do primeiro gene *mcr-3.1* descrito no plasmídeo pWJ1 (KY924928.1), e vários outros plasmídeos transportados por espécies de Enterobacteriaceae resistentes à colistina, como cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Shigella* e *Salmonella*. Além disso, DGK se demonstrou essencial para a expressão do fenótipo de resistência a polimixina mediada por *eptA* e *mcr-1*, o que sugere que DGK poderia ter um papel importante na via de

expressão fisiológica da resistência à colistina por BGNs mediada por *mcr-3* e suas variantes (YANG *et al.*, 2022).

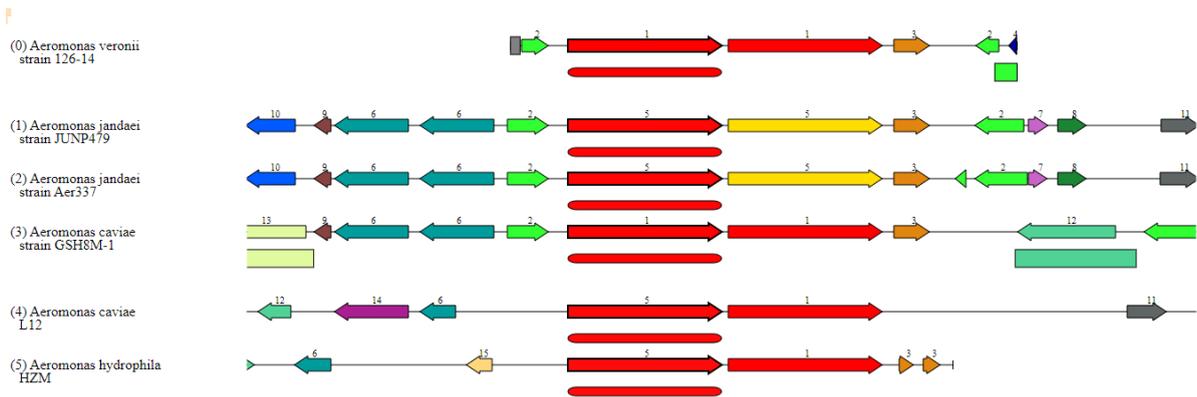
Os outros dois genes que codificam PEtN-transferase, *mcr-3-like-a* e *mcr-3-like-b*, foram identificados próximos em uma *contig* de 174 kb de comprimento montado e separados por apenas 66 pb, como observado em Aer337 e outros genomas de espécies de *Aeromonas* (LING *et al.*, 2017). Os dois genes *mcr-3* comumente aparecem entre as espécies de *Aeromonas*, mas podem não ser naturais do gênero, levando o gênero *Aeromonas* a ser provavelmente um reservatório de variantes alélicas de genes móveis de resistência à colistina.

O gene *dgkA* estava presente a jusante do gene relacionado ao *mcr-3-like-b* (EHZ47_RS10795), semelhante ao encontrado em *A. veronii* 17ISAe (CP028133), *A. veronii* 172 (MF495680.1), *A. caviae* GSH8M-1 (AP019195 .1), *A. veronii* w55 (MH481281) e FC951 (CP032839), que também possuem genes *mcr* adjacentes e foram agrupados em um mesmo clado de árvore filogenética (Figura 14). Vale ressaltar que esses dois segmentos *mcr-3-like-a* e *dgkA* de Aer337 compartilham apenas cerca de 70% da identidade nucleotídica entre eles, levando a crer que esses segmentos no cromossomo Aer337 tenham múltiplas fontes e resultaram de eventos de recombinação separados.

A proteína MCR-3-like-a da família MCR-3 estava mais intimamente relacionada com a variante MCR-3.27 atribuída de acordo com a análise filogenética de proteínas MCR e mostra 99,2% de identidade de sequência de aminoácidos. Enquanto, sua proteína MCR-3-like-b relacionada à MCR-3 codificadora a jusante apareceu em um ramo monofilético, mas descendente de um nó ancestral MCR-3, mostrando até 86% de semelhança de sequência de aminoácidos com o mais próximo atribuído a variantes de MCR-3.21 e MCR-3.1 transportadas por plasmídeo de *K. pneumoniae* e *E. coli*.

A proteína MCR-3-like-b mostra relação mais próxima com outras PEtN-transferases cromossômicas encontradas em diferentes loci de genomas de espécies de *Aeromonas*, como as cepas *A. veronii* 172, *A. caviae* L12 e *A. dhakensis* 173.

Figura 14. Contexto genético dos genes *mcr-3-like-b* e *mcr-3-like-c* entre genomas de *Aeromonas* spp..



Legenda: Contexto genético dos genes *mcr-3-like-a* (seta vermelha) e *mcr-3-like-b* (seta amarela) de Aer337, sendo flanqueado *upstream* por (seta verde) e *downstream* por DGKA (seta marrom)

Fonte: autor

O isolado clínico da espécie *Aeromonas jandaei* JUNP478, isolada no Nepal, também apresentou quatro cópias de PEtN-transferase no seu genoma 23 e se apresentou altamente similar às identificadas no genoma da Aer337. De acordo com o CARD, as quatro cópias apresentam identidade >79% para MCR-3 e MCR-7. O contexto genético das cópias identificadas em Aer337 e JUNP478 também apresentaram-se semelhantes, sugerindo que os possíveis processos de recombinação em *Aeromonas* estejam acontecendo de maneira independente e promovendo o surgimento de novas variantes de *mcr*.

Todas as quatro cópias de PEtN-transferase de JUNP478 foram capazes de induzir a resistência à colistina quando clonadas em *E. coli* e *A. hydrophila*. A sequência de aminoácidos entre as PEtN-transferase identificadas em Aer337 e JUNP478 apresentam alta similaridade e apesar de apresentar algumas alterações na sequência de aminoácidos nas regiões transmembrana da proteína, sugerindo que Aer337 também possa atuar como reservatório e disseminador de genes de resistência à colistina em ambientes clínicos e aquáticos.

5.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS PROTEÍNAS VARIANTES DE MCR

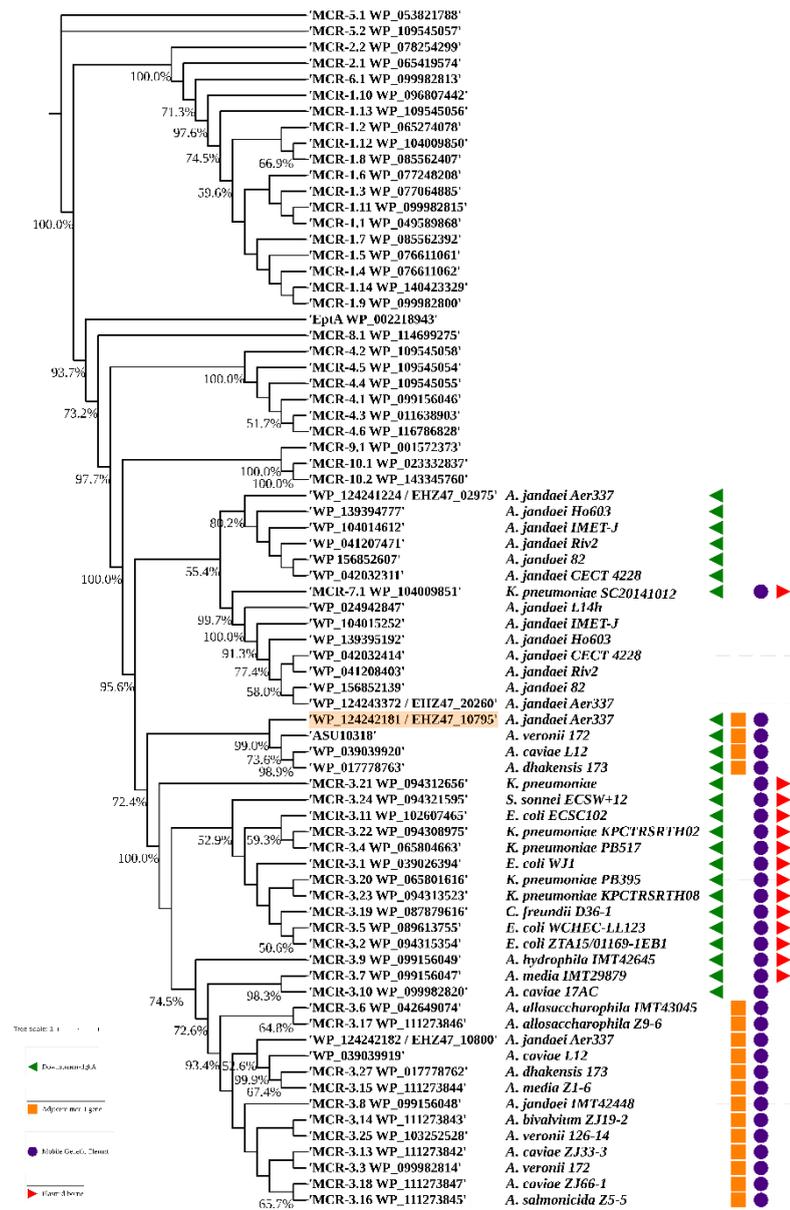
A análise filogenética das sequências de aminoácidos das variantes das

proteínas MCR separou os membros da família MCR-3 em subgrupos e está apresentada na Figura 15. O primeiro clado é composto pelas variantes MCR-3 mediadas por plasmídeos, que possuem o gene *dgkA* a jusante e foram identificadas quase exclusivamente genomas de Enterobacteriaceae. Um segundo clado foi intimamente relacionado com as variantes encontradas em espécies de *Aeromonas* com o gene relacionado ao *mcr-3* adjacente e em associação a elementos genéticos móveis, incluindo a proteína MCR-3-like-a do tipo MCR de Ae337.

Outro clado de proteínas relacionadas à MCR, que co-ocorrem em algumas cepas de *A. jandaei*, mas aparecem separadas em dois subclados distintos, diferindo na presença do gene *dgkA* a jusante, provavelmente sugerindo uma fonte gênica distinta. A variante MCR-7.1 plasmidial, que formou um subclado monofilético e foi descrita a partir de um isolado de *K. pneumoniae* resistente à colistina, apresentando-se a jusante *dgkA-like*, como foi identificado em outras cepas do gênero *Aeromonas*.

A proteína MCR-3-like-b relacionada ao MCR-3 de Ae337 formou um pequeno clado com outras proteínas semelhantes de *Aeromonas* PETN-transferase, cujo contexto genético dos genes codificadores foi identificado nas *Aeromonas* compartilhando características comuns, como a presença de *downstream dgkA-like* e o gene vizinho do tipo *mcr-3* a montante, além de MGEs associados. Juntamente com a variante MCR-2.21 codificada por plasmídeo (suportada por um valor de bootstrap de 100%), essas proteínas da família MCR-3 intimamente relacionadas de *Aeromonas* dividem claramente a topologia da árvore filogenética MCR-3 entre as variantes MCR-3 encontradas em associação ao MGE e/ou carregado por plasmídeos e aqueles que codificam cromossomicamente a PETN-transferase da espécie *Aeromonas*, provavelmente natural do gênero.

Figura 15. Árvore filogenética das proteínas de referência e variantes de MCR.



Legenda: Árvore filogenética obtida pelo método PhyML utilizando a sequência de aminoácidos das variantes de proteínas MCR já descritas no banco de dados do ResFinder e PEA-transferases putativas de *Aeromonas* spp. incluindo as quatro cópias de *A.jandaei* Aer337. Os triângulos verdes representam a presença do gene *dgkA* a jusante de *mcr-3*; os quadrados laranjas representam a ocorrência de dois genes semelhantes a *mcr-3* adjacentes; os círculos roxos e os triângulos vermelhos indicam a presença de elementos genéticos móveis (MGE) e a presença do gene *mcr-3* em plasmídeos, respectivamente.

Fonte: autor

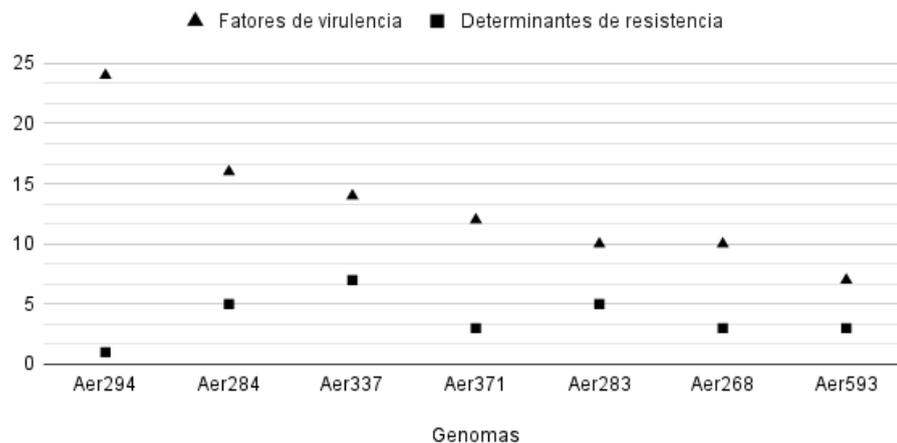
5.8 RELAÇÃO FATORES DE VIRULÊNCIA E DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA

A relação entre o repertório de virulência e genes de resistência também foi estudada e está apresentada no Figura 16. De maneira geral, os 71 genomas do grupo de referência apresentaram média 15 fatores de virulência e 5 determinantes de resistência aos antibióticos. Por outro lado, o grupo de genomas oriundos de SBU apresentou-se organizado quantitativamente de maneira similar com em média 12 fatores de virulência e 3 determinantes de resistência aos antibióticos.

De maneira geral os genomas que apresentam quantitativamente os maiores repertório de virulência bacteriana abrigam um repertório de determinantes de resistência menor. Os genomas de *A. veronii* isolate KLG9, *A. veronii* CCM 7244, *A. veronii* VBF557, *A. veronii* 312M, *A. veronii* CCM 4359 e *A. veronii* AK247 abrigaram um repertório de fatores de virulência acima da média para o grupo de referência enquanto apresentaram um repertório de determinantes de resistência abaixo da média.

Figura 16. Relação entre o número de fatores de virulência e os determinantes de resistência dos isolados de SBU.

Relação entre os fatores de virulencia e determinantes de resistencia



Fonte: autor

O genoma do isolado *A. australiensis* Aer294, que foi classificado com o maior potencial virulento de deste estudo, seguiu a mesma organização citada acima e abrigou apenas o gene bla_{OXA-12} como determinante de resistência a antibióticos. Acredita-se que durante o processo evolutivo da interação entre patógeno-hospedeiro algumas bactérias adquiriram genes relacionados à adaptação aos sistemas imunes dos hospedeiros, se tornando mais virulentas; e por outro ramo evolutivo, principalmente pela incentivado pela pressão seletiva do uso de agente antimicrobianos, algumas bactérias adquiriram genes relacionados à resistência a antibióticos. De maneira geral, entende-se que a alta expressão de genes de virulência e resistência aos antibióticos influencie na aptidão bacteriana (BECEIRO *et al.*, 2013). Dessa forma, a relação repertório de virulência e determinantes de resistência do isolado clínico Aer294 pode ser como a ascensão de uma linhagem potencialmente hipervirulenta dentro do gênero *Aeromonas*.

Os genomas de *A. hydrophilla* Aer284 e *A. jandaei* Aer337 abrigaram, respectivamente, um repertório de fatores de virulência e resistência quantitativamente superior à média observada no grupo de referência. Mais de 56% dos isolados do grupo de referência que foram isolados de amostras clínicas apresentaram pelo menos um dos repertórios de virulência e resistência igual ou superior à 15 fatores de virulência que foi a média do grupo. Esses resultados podem auxiliar a entender a relação destes isolados ao surto diarreico no município de São Bento do Una no ano de 2004.

Por outro lado os genomas de *A. trota* Aer371, *A. caviae* Aer268, *A. caviae* Aer593 e *A. dharkensis* Aer283 apresentaram quantitativamente um repertório de fatores de virulência e resistência inferior à média observada no grupo de referência. Vale ressaltar que a patogenicidade bacteriana atua como uma balança entre os fatores de virulência do patógeno e os fatores de imunidade do indivíduo. Dessa forma, mesmo apresentando um repertório de fatores de virulência numericamente inferior aos do grupo de referência estes isolados, ainda sim, poderiam estar envolvidos no surto diarreico ocorrido em 2004.

6 CONCLUSÃO

- Os fatores de virulência presentes na maioria dos isolados do estudo são relacionados com o que parece ser as necessidades básicas de patogenicidade e virulência de *Aeromonas* spp. como o processo de colonização, adesão, motilidade, produção e secreção de toxinas, refletindo no seu potencial virulento. Dessa forma, isolados apresentaram um conjunto de fatores de virulência que estão relacionados com o processo de infeccioso
- O isolado *A. australiensis* Aer294 apresentou o maior potencial virulento dentro isolados do estudo, sobretudo maior que potencial virulento de cepas reconhecidamente virulentas dentro do gênero.
- A diversidade de fatores de virulência encontrados nos isolados clínicos e ambientais incluídos nesse estudo, bem como naqueles genomas de *Aeromonas* spp. de referência, reforça a multiplicidade e complexidade dos fatores de virulência e patogenicidade desse gênero.
- Pela ausência de Elementos Genéticos Móveis no locus dos genes blaOXA é reforçada a ideia de resistência intrínseca aos betalactâmicos por algumas por *Aeromonas*;
- A cepa Aer337 abriga quatro genes que codificam fosfoetanolamina transferases que apresentaram forte semelhança com *mcr-3* (*mcr-3-like-a*, *mcr-3-like-b* e *mcr-3-like-c*) e *mcr-7* (*mcr-7-like*).
- O gênero *Aeromonas* pode atuar como reservatório e disseminador de genes *mcr-3* e *mcr-7* dentro de ambientes aquáticos

REFERÊNCIAS

- AL-BENWAN, Khalifa., *et al.* Cystitis Caused by *Aeromonas caviae*. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 45, n. 7, p. 2348-2350, julho 2007.
- ALBERT, M. John, *et al.* Prevalence of Enterotoxin Genes in *Aeromonas* spp. Isolated From Children with Diarrhea, Healthy Controls, and the Environment. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 38, n. 10, p. 3785-3790, outubro 2000.
- ALPERI, Anabel; FIGUERAS, Maria J.. Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. **International Microbiology**, [S.L.], n. 11, p. 185-194, maio 2008.
- ANJUR, Norashikin; *et al.* An update on the ornamental fish industry in Malaysia: *Aeromonas hydrophila*-associated disease and its treatment control. **Veterinary World**, [S.L.], p. 1143-1152, maio 2021.
- ARAVENA-ROMÁN, Max *et al.* *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 63, n. 6, p. 2270-2276, junho 2013.
- BECEIRO, Alejandro; TOMÁS, María; BOU, Germán. Antimicrobial Resistance and Virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world?. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 185-230, abril 2013.
- CHOI, Jae-Phil, *et al.* Clinical Significance of Spontaneous *Aeromonas* Bacterial Peritonitis in Cirrhotic Patients: a matched case :control study. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 66-72, julho 2008.
- CHOPRA, Ashok K.; HOUSTON, Clifford W.. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. **Microbes And Infection**, [S.L.], v. 1, n. 13, p. 1129-1137, novembro 1999.
- 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. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, [S.L.], v. 43, n. 4, p. 855-856, outubro 1993.
- COLWELL, R. R.; MACDONELL, M. T.; LEY, J. de. Proposal to Recognize the Family *Aeromonadaceae* fam. nov. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 473-477, 1 julho 1986.

DAHANAYAKE, P.s. *et al.*, Prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Aeromonas* species isolated from marketed cockles (*Tegillarca granosa*) in Korea. **Letters In Applied Microbiology**, [S.L.], v. 71, n. 1, p. 94-101, janeiro. 2020.

DEGIACOMI, Matteo T *et al.* Molecular assembly of the aerolysin pore reveals a swirling membrane-insertion mechanism. **Nature Chemical Biology**, [S.L.], v. 9, n. 10, p. 623-629, 4 agosto 2013.

DE MELO, Beatriz Souza Toscano *et al.*, High-resolution genome-wide analysis is essential for the identification of ambiguous *Aeromonas* strains. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 366, n. 21, p. 1-6, 1 novembro 2019.

FERNÁNDEZ-BRAVO, Ana; FIGUERAS, Maria José. An Update on the Genus *Aeromonas*: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 129, 17 janeiro 2020.

FOUQUET, H. *et al.*. Pneumopathie à *Aeromonas* liée aux noyades. **Revue Des Maladies Respiratoires**, [S.L.], v. 35, n. 9, p. 959-962, novembro 2018.

GONZALEZ-AVILA, *et al.*. Colistin Resistance in *Aeromonas* spp. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 11, p. 5974, junho 2021

HOFER, Ernesto., *et al.* Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarreica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 217-220, abril 2006.

KIEFFER, Nicolas, *et al.*. *mcr-9* , an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in *Escherichia coli*, and Its Origin. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 63, n. 9, p. 1, setembro 2019.

KOMEDA, Tomok., *et al.* Emergence of a highly colistin-resistant *Aeromonas jandaei* clinical isolate harbouring four genes encoding phosphoethanolamine transferases in Nepal. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [S.L.], v. 59, n. 4, p. 106544, abril 2022.

LING, Zhuoren., *et al.* Chromosome-Mediated *mcr-3* Variants in *Aeromonas veronii* from Chicken Meat. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 61, n. 11, p. 1-5, novembro 2017.

LIU, Bo., *et al.* VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 912-917, novembro 2021.

MALTZ, Michele; GRAF, Joerg. The Type II Secretion System Is Essential for Erythrocyte Lysis and Gut Colonization by the Leech Digestive Tract Symbiont

Aeromonas veronii. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 77, n. 2, p. 597-603, janeiro 2011.

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. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 412-421, julho 1992.

PESSOA, Rafael Bastos Gonçalves; et al. The genus *Aeromonas*: a general approach. **Microbial Pathogenesis**, [S.L.], v. 130, p. 81-94, maio 2019.

PURCELL, Alexandria B.; VOSS, Bradley J.; TRENT, M. Stephen. Diacylglycerol Kinase A Is Essential for Polymyxin Resistance Provided by EptA, MCR-1, and Other Lipid A Phosphoethanolamine Transferases. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 204, n. 2, p. 1-13, fevereiro 2022.

SEN, Keya; LYE, Dennis. Importance of flagella and enterotoxins for *Aeromonas* virulence in a mouse model. **Canadian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 53, n. 2, p. 261-269, fevereiro 2007.

SHA, Jian *et al.* Evaluation of the roles played by Hcp and VgrG type 6 secretion system effectors in *Aeromonas hydrophila* SSU pathogenesis. **Microbiology**, [S.L.], v. 159, n. 6, p. 1120-1135, junho 2013.

SUN, Jian; *et al.* Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 26, n. 9, p. 794-808, setembro 2018.

SESHADRI, Rekha *et al.* Genome Sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 T: jack of all trades. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 188, n. 23, p. 8272-8282, dezembro 2006.

TEUNIS, Peter; FIGUERAS, Maria J.. Reassessment of the Enteropathogenicity of Mesophilic *Aeromonas* Species. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, p. 1395-1407, 21 setembro 2016.

TOMÁS, J. M.. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. **Isrn Microbiology**, [S.L.], v. 2012, p. 1-22, 4 setembro 2012.

VILA, Jordi, *et al.* *Aeromonas* spp. and Traveler's Diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 552-555, maio 2003

VILCHES, Silvia *et al.* *Aeromonas hydrophila* AH-3 Type III Secretion System Expression and Regulatory Network. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 75, n. 19, p. 6382-6392, outubro 2009.

WAHL, Astrid., *et al.* Antagonistic regulation of *dgkA* and *plsB* genes of phospholipid synthesis by multiple stress responses in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 80, n. 5, p. 1260-1275, abril 2011.

WANG, Yan., *et al.*, Prevalence and Genetic Analysis of Chromosomal *mcr-3/7* in *Aeromonas* From U.S. Animal-Derived Samples. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 12, p. 1-10, abril. 2021.

WANG, Gehua., *et al.* Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by Multiplex PCR. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 41, n. 3, p. 1048-1054, março 2003.

XU, Yongchang., *et al.* Spread of MCR-3 Colistin Resistance in China: an epidemiological, genomic and mechanistic study. **Ebiomedicine**, [S.L.], v. 34, p. 139-157, agosto 2018.

YANG, Yong-Qiang., *et al.* Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 73, n. 7, p. 1791-1795, abril 2018.

RIGATTO, Maria Helena; FALCI, Diego R.; ZAVASCKI, Alexandre P.. Clinical Use of Polymyxin B. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [S.L.], p. 197-218, maio 2019.

LI, Zekun *et al.*. Emergent Polymyxin Resistance: end of an era?. **Open Forum Infectious Diseases**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. 1-10, 17 agosto 2019.

LING, Zhuoren *et al.* Chromosome-Mediated *mcr-3* Variants in *Aeromonas veronii* from Chicken Meat. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 61, n. 11, p. 1-5, novembro 2017.