

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Lívia Christina Alves da Silva

**Caracterização molecular de isolados clínicos e
ambientais de *Aeromonas* spp. obtidos no estado de
Pernambuco**

Recife
2015

Lívia Christina Alves da Silva

Caracterização molecular de isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* spp. obtidos no estado de Pernambuco

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino

Coorientadora: Dra. Nilma Cintra Leal

Recife

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Livia Christina Alves da
Caracterização molecular de isolados clínicos e ambientais de
***Aeromonas* spp. obtidos no Estado de Pernambuco/ Livia Christina Alves da**
Silva– Recife: O Autor, 2015.

122 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Tereza Cristina Leal Albino

Coorientadora: Nilma Cintra Leal

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2015.

Inclui bibliografia e anexos

1. Aeromonas 2. Diarréia 3. Filogenia I. Albino, Tereza Cristina
Leal (orientadora) II. Leal, Nilma Cintra (coorientadora) III.
Título

579.33

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015- 87

Lívia Christina Alves da Silva

**Caracterização molecular de isolados clínicos e ambientais de
Aeromonas spp. obtidos no estado de Pernambuco**

Aprovado em 04 / 03 / 2015

Banca Examinadora:

**Dra. Tereza Cristina Leal Balbino (Orientadora)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)**

**Dr. Danilo Elias Xavier
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)**

**Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)**

**Dra. Milena de Paiva Cavalcanti
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)**

**Dra. Maria Paloma Silva de Barros
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)**

Recife

2015

Dedico este trabalho às pessoas que mais me amam nessa vida, meus pais Ivanalda e José Caetano, minha irmã Laís e meu esposo Artur.

Agradecimentos

Agradeço infinitamente a Deus que não me abandonou um só momento desta trajetória, sempre me pondo de pé para mais um dia de batalha.

Às minhas orientadoras, Dra. Tereza Cristina Leal Balbino e Dra. Nilma Cintra Leal, pela confiança que me creditaram e pelos ensinamentos indispensáveis para a concretização deste trabalho.

À Dra. Carina Mendes Marques, pela colaboração na correção desta tese e ao Dr. Antônio Mauro Rezende, pela ajuda nos experimentos de bioinformática.

À minha família, principalmente aos meus pais, pelo amor e pelas orações a mim dedicados. Vocês são meu porto seguro e espero nunca decepcioná-los.

À pessoa mais importante que entrou em minha vida, meu esposo Artur, que sinceramente merecia um troféu por ter me aguentado durante esses anos. Tenha certeza, Amor, que você será recompensado nos céus pela paciência e dedicação que tem por mim. Obrigada por mesmo sem entender nada sobre as “microheterogeneidades intragenômicas”, ter me ouvido e até mesmo dado sugestões.

Aos amigos maravilhosos, que são tantos que para não esquecer ninguém não citarei nomes. Meus verdadeiros amigos saberão nesse momento que essas palavras são para eles. Obrigada por terem me feito sorrir tantas vezes. Não esquecerei nenhum de vocês onde quer que eu esteja.

Agradeço aos técnicos do Departamento de Microbiologia do CPqAM, Silvana Santos, Fabiana Almeida, Cláudio Cavalcanti, Bruna Santos e Yara Nakazawa pelo suporte prestado.

À equipe do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM, Viviane Carvalho e Cássia Docena pela contribuição com o sequenciamento de DNA.

Aos membros da banca examinadora que generosamente atenderam o convite para contribuir com este trabalho.

“Apliquei-me a conhecer a sabedoria e a considerar a fadiga que se realiza sobre a terra, pois o homem não conhece repouso, nem de dia, nem de noite. Observei o conjunto da obra de Deus e percebi que o homem não consegue descobrir tudo o que acontece debaixo do sol. Por mais que o homem se afadigue em pesquisar, não chega a compreendê-la. E mesmo que o sábio diga que a conhece, nem por isso é capaz de entendê-la.”

(Eclesiastes 8, 16-17)

Resumo

Aeromonas são habitantes nativos de ambientes aquáticos e, recentemente, têm sido considerados patógenos humanos emergentes. As gastroenterites são as infecções mais comumente relacionadas a esse gênero. Nesse estudo, 119 isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas*, obtidos durante um surto de diarreia ocorrido em São Bento do Una, Pernambuco, foram avaliados quanto à prevalência das espécies, estrutura genética da população e potencial de virulência. A análise das sequências dos genes 16S rRNA e *gyrB* revelou a predominância de *A. caviae* (66,4%), seguida por *A. veronii* (14,2%); *A. aquariorum* (9,2%); *A. hydrophila* e *A. trota* (3,4%) e *A. jandaei* (1,7%). Dois isolados não foram identificados entre as espécies conhecidas de *Aeromonas*, sugerindo pertencerem a novas espécies. A rede filogenética construída com base no gene 16S rRNA revelou uma estrutura populacional epidêmica, envolvendo quase todos os isolados de *A. caviae*, sendo possível identificar um genótipo fundador e seus descendentes. Os genes de virulência *alt*, *ast* e *hlyA* foram detectados entre os isolados com frequências de 81,5%; 13,4% e 11,8%, respectivamente. Este estudo revelou que a análise filogenética de sequências concatenadas dos genes 16S rRNA e *gyrB* é um eficiente marcador taxonômico para o gênero *Aeromonas*. Foi detectado elevado potencial de virulência entre as espécies de *Aeromonas* identificadas, principalmente entre *A. hydrophila*, *A. aquariorum* e *A. caviae*. As características marcantes observadas sugerem que a espécie *A. caviae* teve importante participação nos casos de diarreia relatados em São Bento do Una, Pernambuco.

Palavras-chave: *Aeromonas*; diarreia; filogenia; virulência.

Abstract

Aeromonas are native inhabitants of aquatic environments and have recently been considered emerging human pathogens. The gastroenteritis are the most commonly infections related to this genus. In this study, 119 clinical and environmental isolates of *Aeromonas* obtained from a diarrhea outbreak in São Bento do Una, Pernambuco, were evaluated for the species prevalence, population genetic structure and virulence potential. The 16S rRNA and *gyrB* genes sequences analysis revealed the predominance of *A. caviae* (66.4%), followed by *A. veronii* (14.2%); *A. aquariorum* (9.2%); *A. trota*, *A. hydrophila* (3.4%) and *A. jandaei* (1.7%). Two isolates were not identified among known species of *Aeromonas*, suggesting they belong to new species. Phylogenetic network built based on 16S rRNA gene revealed an epidemic population structure, involving almost all isolates of *A. caviae*, founder and descendants genotypes were identified. Virulence genes *alt*, *ast* and *hlyA* were carried by the isolates in a frequency of 81.5%; 13.4% and 11.8%, respectively. This study revealed that phylogenetic analysis of the 16S rRNA and *gyrB* genes concatenated sequences is an efficient taxonomic marker for the genus *Aeromonas*. Was detected high virulence potential between *Aeromonas* species identified, mainly between *A. hydrophila*, *A. aquariorum* and *A. caviae*. The striking features observed suggest that the *A. caviae* species played an important role on diarrhea cases reported in São Bento do Una, Pernambuco.

Keywords: *Aeromonas*; diarrhea; phylogeny; virulence.

Lista de Ilustrações

Figura	Página
Figura 1. Coloração de Gram de bacilos de <i>Aeromonas hydrophila</i> .	3
Figura 2. Árvore filogenética indicando as relações entre a família Enterobacteriaceae e os gêneros <i>Vibrio</i> e <i>Aeromonas</i> .	5
Figura 3. Fontes ambientais de espécies de <i>Aeromonas</i> que potencialmente podem levar à infecção ou colonização em humanos.	8
Figura 4. Esquema do <i>rrn</i> operon de <i>Escherichia coli</i> em processo de transcrição.	13
Figura 5. Estrutura da DNA girase.	16
Figura 6. Árvore filogenética (<i>neighbor-joining</i>) derivada de sequências do gene 16S rRNA (1454 pb).	34
Figura 7. Identificação de microheterogeneidades intragenômicas na sequência do gene 16S rRNA.	35
Figura 8. Árvore filogenética (<i>neighbor-joining</i>) derivada de sequências do gene <i>gyrB</i> (920 pb).	39
Figura 9. Árvore filogenética (<i>neighbor-joining</i>) derivada de sequências de aminoácidos da proteína GyrB (306 aa).	40
Figura 10. Árvore filogenética (<i>neighbor-joining</i>) derivada de sequências concatenadas dos genes 16S rRNA e <i>gyrB</i> (2374 pb).	43
Figura 11. Árvore filogenética circular (<i>neighbor-joining</i>) derivada das sequências concatenadas dos genes 16S rRNA e <i>gyrB</i> (2374 pb).	44
Figura 12. Diagrama eBURST baseado nas sequências do gene 16S rRNA de isolados e cepas de referência de <i>Aeromonas</i> .	52

Figura 13. Distribuição geral de 48 isolados de *Aeromonas* no município de São Bento do Una, Pernambuco. 61

Figura 14. Distribuição dos 30 isolados de *Aeromonas* obtidos de pacientes que residiam em áreas urbanas do município de São Bento do Una, Pernambuco. 62

Lista de Tabelas

Tabela	Página
Tabela 1. Espécies atualmente aceitas do gênero <i>Aeromonas</i> .	6
Tabela 2. Características gerais dos genomas completos de quatro espécies de <i>Aeromonas</i> .	11
Tabela 3. Sequências de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes analisados neste estudo.	25
Tabela 4. Resultados da identificação em nível de espécie de 119 isolados de <i>Aeromonas</i> , baseados em três métodos: filogenia dos genes 16S rRNA- <i>gyrB</i> , RFLP do 16S rRNA e testes fenotípicos.	47
Tabela 5. Comparação dos resultados da identificação em nível de espécie de 119 isolados de <i>Aeromonas</i> por três métodos de análise: testes fenotípicos, RFLP do 16S rRNA e filogenia dos genes 16S rRNA- <i>gyrB</i> .	48
Tabela 6. Distribuição de 119 isolados e 26 cepas de referência de <i>Aeromonas</i> entre os 59 diferentes genótipos identificados pelo algoritmo eBURST a partir do gene 16S rRNA.	53
Tabela 7. Distribuição de genes de virulência entre as espécies clínicas e ambientais de <i>Aeromonas</i> confirmadas em surto de diarreia ocorrido no município de São Bento do Una – PE.	57

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
aa	Aminoácido
AFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)
ATCC	Coleções Americanas de Culturas Microbianas (<i>American Type Culture Collection</i>)
ArcGis	American River College - Sistema de Informações Geográficas (<i>American River College - Geographic Information Systems</i>)
ArcMap	American River College - Mapa (<i>American River College - Map</i>)
BHI	Infusão de Cérebro e Coração (<i>brain heart infusion</i>)
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DMSO	Sulfóxido de dimetilo (Dimethyl sulfoxide)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato (<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
FDA	Administração de Alimentos e Drogas (<i>Food and Drug Administration</i>)
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
ERIC	Consenso Intergênico Repetitivo de Enterobactérias (<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>)
GC	Guanina e citosina
GenBank	Banco de dados genômicos do NCBI
kCl	Cloreto de potássio
Mb	Megabases

MEGA	Análise Genética da Evolução Molecular (<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MLPA	Análise Filogenética de Multilocus (<i>Multilocus Phylogenetic Analysis</i>)
MLSA	Análise de Sequências de Multilocus (<i>Multilocus Sequence Analysis</i>)
mM	Milimolar
Muscle	Comparação de Múltiplas Sequências por Log - Expectativa (<i>Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation</i>)
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
ng	Nanograma
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pmol	Picomol
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado (<i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>)
RAPD	Polimorfismo de DNA Amplificado Aleatoriamente (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
RFLP	Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
rRNA	RNA ribossomal (<i>Ribosomal RNA</i>)
spp	Espécies (species)

tRNA	RNA transportador (<i>transfer RNA</i>)
U	Unidade
UV	Ultravioleta
μl	Microlitro
~	Aproximadamente

Sumário

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Ilustrações	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	xii
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	3
2.1 O gênero <i>Aeromonas</i>	3
2.2 Taxonomia	4
2.3 Epidemiologia	6
2.4 Métodos fenotípicos para identificação de <i>Aeromonas</i>	9
2.5 Métodos moleculares para identificação e tipagem de <i>Aeromonas</i>	10
2.5.1 Gene 16S rRNA	12
2.5.2 Genes <i>housekeeping</i>	15
2.5.2.1 Gene <i>gyrB</i>	16
2.6 Métodos filogenéticos para identificação e análise populacional de <i>Aeromonas</i>	17
2.7 Tratamento e perfil de sensibilidade a antimicrobianos	18
2.8 Mecanismos de virulência e patogenicidade	19
3. Objetivos	22
3.1 Objetivo geral	22

3.2 Objetivos específicos	22
4. Material e Métodos	23
4.1 Isolados bacterianos e extração de DNA	23
4.2 Amplificação e sequenciamento dos genes 16S rRNA e <i>gyrB</i>	24
4.3 Análise filogenética dos genes 16S rRNA e <i>gyrB</i>	26
4.4 Rede filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA	27
4.5 Detecção de genes de virulência	28
4.6 Distribuição dos isolados de <i>Aeromonas</i> nas áreas urbanas e rurais do município de São Bento do Una, Pernambuco	30
5. Resultados	31
5.1 Análise filogenética do gene 16S rRNA	31
5.2 Análise filogenética do gene <i>gyrB</i>	36
5.3 Análise filogenética baseada nas sequências concatenadas dos genes 16S rRNA e <i>gyrB</i>	41
5.4 Comparação dos métodos: filogenia dos genes 16S rRNA- <i>gyrB</i> , RFLP do 16S rRNA e testes fenotípicos, para a identificação de espécies de <i>Aeromonas</i> .	45
5.5 Rede filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA	49
5.6 Detecção de genes de virulência	54
5.7 Distribuição e características dos isolados de <i>Aeromonas</i> nas áreas urbanas e rurais do município de São Bento do Una, Pernambuco	58
6. Discussão	63

7. Conclusões	76
8. Referências	77
9. Anexos	87
9.1 Sequências de cepas de referência utilizadas nesse estudo e seus respectivos números de acesso	87
9.2 Isolados de <i>Aeromonas</i> e respectivas coordenadas geográficas de latitude e longitude (graus, minutos e segundos)	88
9.3 Diferentes perfis de genes de virulência encontrados entre 119 isolados de <i>Aeromonas</i>.	89
9.4 Artigo a ser submetido para a revista PLOS ONE	92
10. Currículo Lattes	119

1. Introdução

O gênero *Aeromonas*, família Aeromonadacea, compreende um grupo de bactérias Gram negativas, autóctones de ambientes aquáticos e inclui espécies patogênicas para humanos e animais. Sua prevalência em ambientes aquáticos tem sido reconhecida como um potencial risco à saúde e por conta disso alguns países tem adotado a contagem dessas bactérias como um indicador adicional da qualidade da água. As manifestações clínicas mais comuns de infecções por *Aeromonas* são as gastroenterites e pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos são suscetíveis a essas infecções. *A. hydrophila*, *A. veronii* e *A. caviae* são as espécies mais frequentemente associadas à diarreia em humanos, sendo água e alimentos contaminados as maiores fontes dessas infecções.

A taxonomia do gênero *Aeromonas* é complexa e tem sofrido muitas mudanças ao longo dos anos, devido as novas espécies que têm sido descritas e a introdução de novos critérios de diagnóstico. Alguns autores têm sugerido que a alta identidade das sequências do gene 16S rRNA entre as espécies de *Aeromonas*, pode ter impacto sobre a taxonomia e por isso genes *housekeeping*, como o *gyrB*, têm sido utilizados para dar suporte à inferência taxonômica desse gênero. Ainda no campo da filogenia, redes filogenéticas têm recentemente ganhado importância para estudos da diversidade genética em populações bacterianas, entretanto estudos desse tipo são escassos para o gênero *Aeromonas*.

O mecanismo de patogenicidade de *Aeromonas* não é bem compreendido para nenhuma das infecções humanas. A virulência de *Aeromonas* é considerada

multifatorial e vários desses fatores tem sido identificados em isolados de *Aeromonas* obtidos de ambientes aquáticos e fezes de pacientes com diarreia, assim como vários surtos de diarreia tem sido atribuídos a essa bactéria.

No primeiro semestre de 2004, no município de São Bento do Una, localizado no estado de Pernambuco, ocorreu um surto de diarreia bacteriana. Dentre os 145 casos com cultura positiva, 114 isolados de *Aeromonas* spp. foram identificados como único patógeno presente nas fezes dos pacientes. Em contrapartida perfis homogêneos da Região Espaçadora Intergênica (rRNA 16S-23S) revelaram relação clonal entre os 18 isolados de *Vibrio cholerae* O1 detectados, o que não foi verificado entre os isolados de *Aeromonas*. Apesar da etiologia desse surto ter sido atribuída ao *V. cholerae* O1, a alta prevalência de isolados de *Aeromonas* presente nas fezes dos pacientes, apontou à necessidade de um estudo mais detalhado das características desses isolados.

Diante desse fato, esse trabalho teve como objetivo investigar a prevalência das espécies de *Aeromonas*, comparando a utilização de marcadores filogenéticos e analisar a estrutura genética da população e o potencial de virulência de 119 isolados clínicos e ambientais obtidos durante um surto de diarreia ocorrido no município de São Bento do Una, Pernambuco.

2. Revisão de Literatura

2.1 O gênero *Aeromonas*

O termo *Aeromonas* deriva das palavras gregas “aer” que significa ar ou gás e “monas” que significa unidade, ou seja, unidades produtoras de gás (Martin-Carnahan e Joseph, 2005). *Aeromonas* é um gênero da família Aeromonadaceae e consiste em bactérias Gram negativas que podem aparecer como bacilos ou cocobacilos independentes, aos pares ou em cadeias curtas, anaeróbias facultativas, não-esporuladas, oxidase e catalase positiva, reduzem nitrato a nitrito e são normalmente resistentes ao agente vibriostático O/129 (Popoff, 1984; Janda e Abott, 2010).

As aeromonas podem ser mesofílicas e móveis, geralmente movimentando-se por um flagelo polar, crescendo bem de 35° a 37°C, estas são associadas com uma variedade de infecções humanas, como é o caso da espécie *A. hydrophila* (Figura 1), *A. caviae*, *A. veronii* e muitas outras; ou ainda podem ser imóveis e psicofílicas, com temperaturas ótimas de crescimento entre 22° e 25°C, responsáveis por causar doenças em peixes, anfíbios e répteis. Este último grupo é representado pelas espécies *A. salmonicida* e *A. media* (Parker e Shaw, 2011).



Figura 1: Coloração de Gram de bacilos de *Aeromonas hydrophila*. Disponível em: <http://phil.cdc.gov/>. ID: 1255.

2.2 Taxonomia

A taxonomia do gênero *Aeromonas* é bastante complexa e tem sido submetida a várias revisões devido às novas espécies descritas e a introdução de novos critérios de diagnóstico (Alperi *et al.*, 2008). Apesar do progresso científico, muitas questões relativas a este patógeno permanecem sem resposta, principalmente devido a falta de relação entre as características fenotípicas e genotípicas das espécies (Ormen *et al.*, 2005; Hasan *et al.*, 2006; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010).

O gênero *Aeromonas* foi proposto em 1943 e durante vários anos permaneceu incluído na família Vibrionaceae, devido a algumas semelhanças fenotípicas (Stainer, 1943; Popoff, 1984). Com o advento da tecnologia de sequenciamento de ácidos nucleicos, as relações filogenéticas puderam ser verificadas de forma mais fácil e confiável, sendo os genes codificadores de rRNAs os mais utilizados para estabelecer essas relações entre os organismos (Woese, 1987).

Nas décadas de 1980 e 1990, estudos utilizando o genes 5S rRNA e 16S rRNA demonstraram que o gênero *Aeromonas* apresentava uma posição filogenética suficientemente distante da família Vibrionaceae, constituindo uma família independente, propondo o nome taxonômico de Aeromonadaceae (Colwell *et al.*, 1986; Martinez-Murcia *et al.*, 1992a). Essa proposta foi aceita e publicada na segunda edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2001*, permanecendo até hoje (Martin-Carnahan e Joseph, 2005). A família Aeromonadaceae pertence à ordem *Aeromonadales* e à classe das

Gammaproteobactérias. A Figura 2 mostra o resultado do estudo filogenético baseado nas sequências do gene 16S rRNA realizado por Colwell *et al.*, (1986).

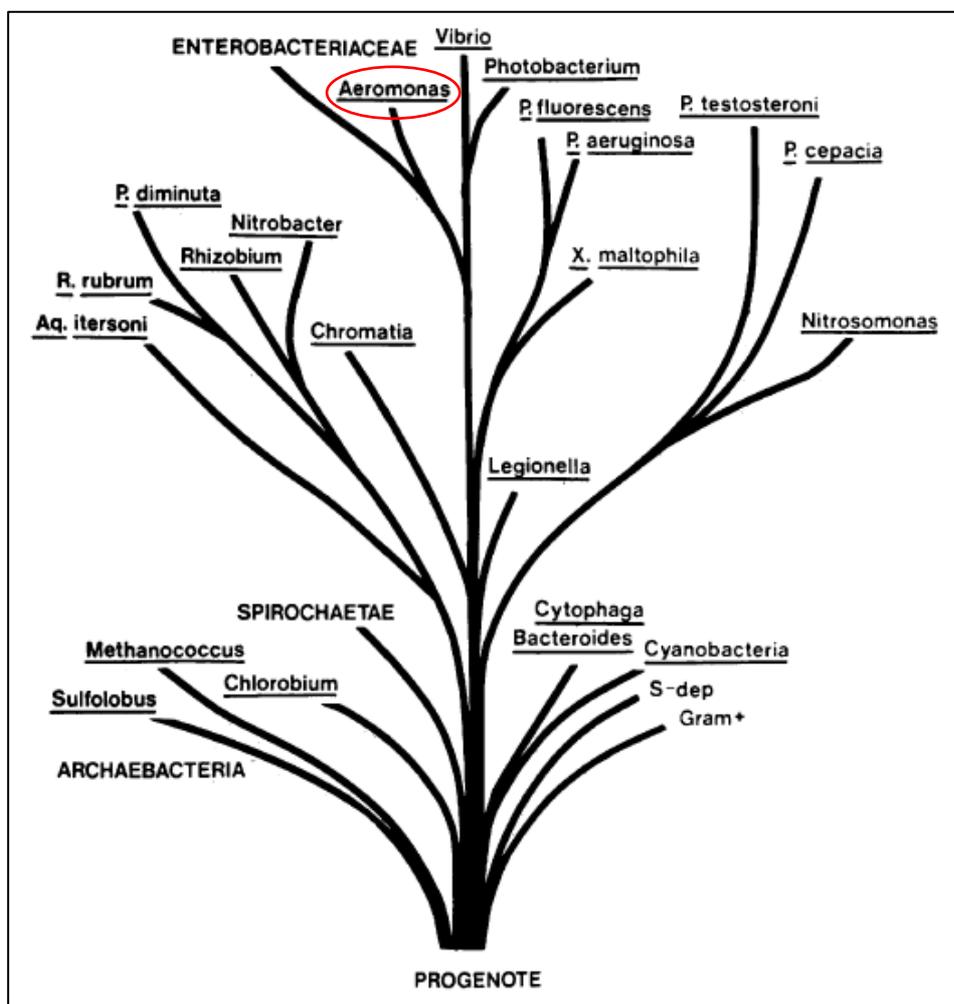


Figura 2: Árvore filogenética indicando as relações entre a família Enterobacteriaceae e os gêneros *Vibrio* e *Aeromonas*. **Fonte:** Colwell *et al.*, 1986.

A taxonomia desse gênero encontra-se em constante atualização não somente pela descrição de novas espécies, mas também pela sua reclassificação (Collins *et al.*, 1993; Huys *et al.*, 2005; Saavedra *et al.*, 2006; Aravena-Roman *et al.*, 2013). Em 2005 eram 18 espécies descritas na última edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Martin-Carnahan e Joseph, 2005), nem todas relacionadas a infecções em humanos (Janda e Abbott, 2010). Em 2013 esse número aumentou para 27 com a descrição das novas espécies, *A. australiensis* e

A. cavernicola (Aravena-Roman *et al.*, 2013; Martínez-Murcia *et al.*, 2013). A tabela abaixo mostra as espécies de *Aeromonas* atualmente descritas.

Tabela 1: Espécies atualmente aceitas do gênero *Aeromonas*.

ESPÉCIES	CEPA	ORIGEM	AUTORES
<i>A. hydrophila</i>	ATCC 7966T	Leite	Stainer, 1943
<i>A. salmonicida</i>	NCIMB 1102T	Salmão	Griffin <i>et al.</i> , 1953
<i>A. sobria</i>	NCIMB 12065T	Peixe	Popoff e Veron 1976
<i>A. media</i>	ATCC 33907T	Água (rio)	Allen <i>et al.</i> , 1983
<i>A. veronii</i>	ATCC 35624T	Muco	Hickman-Brenner <i>et al.</i> , 1987
<i>A. caviae</i>	ATCC 15468T	Cobaia	Schubert e Hegazi, 1988
<i>A. schubertii</i>	ATCC 43700T	Abscesso cutâneo	Hickman-Brenner <i>et al.</i> , 1988
<i>A. eucrenophila</i>	NCIMB 74T	Peixe de água doce	Schubert e Hegazi, 1988
<i>A. jandaei</i>	ATCC 49568T	Fezes humanas	Carnahan <i>et al.</i> , 1991a
<i>A. trota</i>	ATCC 49657T	Fezes humanas	Carnahan <i>et al.</i> , 1991b
<i>A. allosaccharophila</i>	CECT 4199T	Enguia	Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 1992b
<i>A. encheleia</i>	CECT 4342T	Enguia	Esteve <i>et al.</i> , 1995b
<i>A. bestiarum</i>	ATCC 51108T	Peixe doente	Ali <i>et al.</i> , 1996
<i>A. popoffii</i>	LMG 17541T	Água potável	Huys <i>et al.</i> , 1997
<i>A. simiae</i>	IBS S6874T	Fezes de macaco	Harf-Monteil <i>et al.</i> , 2004
<i>A. molluscorum</i>	CECT 5864	Molusco bivalve	Miñana-Galagis <i>et al.</i> , 2004
<i>A. bivalvium</i>	CECT 7113	Molusco bivalve	Miñana-Galagis <i>et al.</i> , 2007
<i>A. aquariorum</i>	MDC47T=DSM18362T	Água (Aquário)	Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 2008
<i>A. tecta</i>	CETC7082T MDC91T	Isolado clínico e ambiental	Demarta <i>et al.</i> , 2008
<i>A. piscicola</i>	S1.2T	Peixe	Beaz-Hidalgo <i>et al.</i> , 2009
<i>A. fluvialis</i>	CECT 7401=LMG 24681	Água (Rio)	Alperi <i>et al.</i> , 2010a
<i>A. sanarellii</i>	A2-67T =CECT 7402T	Ferida	Alperi <i>et al.</i> , 2010b
<i>A. taiwanensis</i>	A2-50T=CECT7403T	Ferida de queimadura	Alperi <i>et al.</i> , 2010b
<i>A. diversa</i>	CECT4254T=ATCC43946T	Ferida	Miñana-Galagis <i>et al.</i> , 2010
<i>A. rivuli</i>	CECT7518T=MDC2511T	Água (riacho)	Figueras <i>et al.</i> , 2011a
<i>A. cavernicola</i>	CCM7641T=CECT7862T)	Água (riacho de caverna)	Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 2013
<i>A. australiensis</i>	266T=CECT8023T	Água(sistema de irrigação)	Aravena-Roman <i>et al.</i> , 2013

2.3 Epidemiologia

As espécies de *Aeromonas* são autóctones de ambientes aquáticos, sendo amplamente distribuídas entre águas poluídas, águas de poços, águas de marés e de rios, águas engarrafadas e até mesmo em águas cloradas, podendo multiplicar e sobreviver em biofilmes nos sistemas de distribuição de água (Martin-Carnahan e Joseph, 2005). Estes microrganismos têm também sido isolados de uma grande variedade de alimentos tais como; vegetais, carnes, pescados e

mariscos, além de outras fontes como animais domésticos, pássaros e insetos (McMahon e Wilson, 2001; Janda e Abbott, 2010; Fontes *et al.*, 2011; Di Pinto *et al.*, 2012).

Inicialmente, *Aeromonas* foi reconhecida apenas como agente causador de doenças sistêmicas em animais peçonhentos. Atualmente, esse microrganismo é considerado também como agente etiológico de uma variedade de complicações infecciosas em humanos imunocompetentes e imunocomprometidos (Janda e Abbott, 2010; Di Pinto *et al.*, 2012). O primeiro caso de infecção em humano (miosite aguda) causado por *Aeromonas* foi descrito em 1954 na Jamaica (Hill *et al.*, 1954) e posteriormente muitos outros casos foram relatados.

As diversas fontes ambientais a partir das quais se pode encontrar *Aeromonas* facilita a exposição constante e interações entre esse gênero e humanos. A Figura 3 mostra as vias pelas quais os seres humanos podem ser infectados/colonizados por espécies de *Aeromonas*. A maioria dos dados disponíveis sugerem que essa bactéria é adquirida principalmente através do contato com água ou através da ingestão de alimentos contaminados, naturalmente expostos a esses microrganismos pela irrigação ou outros processos como a manipulação (Janda e Abbott, 2010). Com a expansão urbana invadindo os ambientes rurais, o potencial de infecções por *Aeromonas* de origens zoonóticas também poderá aumentar (Janda e Abbott, 2010).

A presença de espécies de *Aeromonas* nos ambientes aquáticos tem sido reconhecida como um potencial risco à saúde e por conta disso alguns países têm adotado a contagem de *Aeromonas* como um indicador adicional da qualidade da água (Borchardt *et al.*, 2003). *Aeromonas* está incluída na lista de

candidato a contaminante (*Contaminant Candidate List – CCL*) da água pela Agência de Proteção Ambiental Americana (*U.S. Environmental Protection Agency*), que recomenda aprofundar os conhecimentos e pesquisar a presença de *Aeromonas* em água para consumo (Hasan *et al.*, 2006). Além disso, também está incluída na lista de microrganismos patógenos presentes em alimentos do FDA - *Food and Drug Administration* (Lampel KA, 2012).

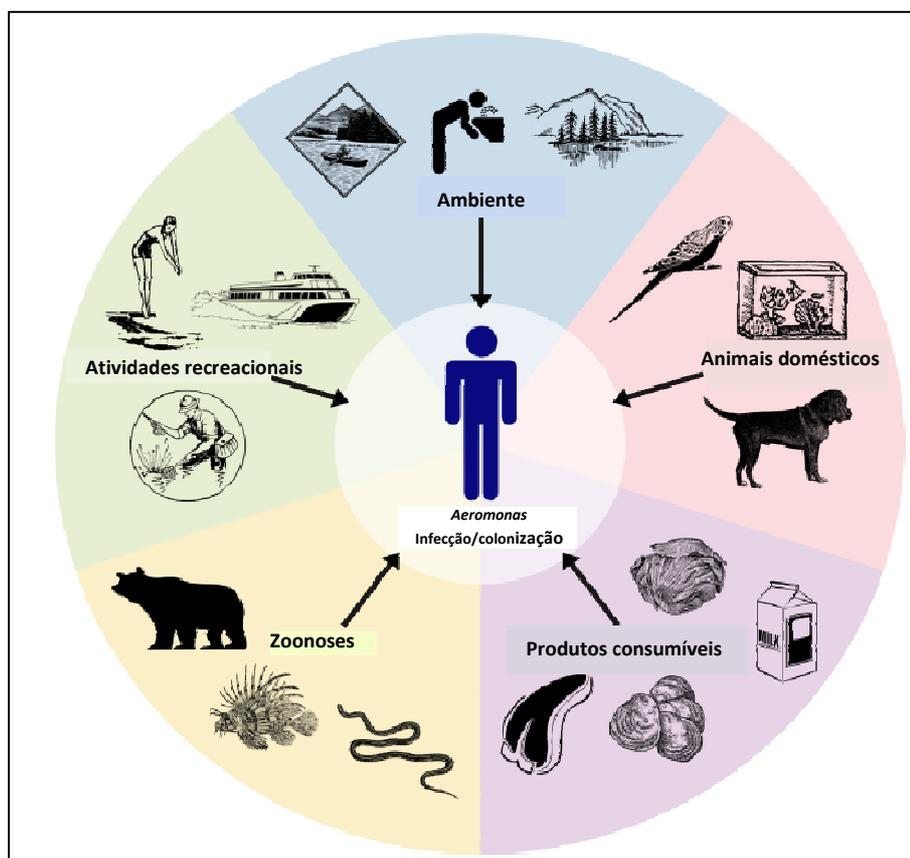


Figura 3: Fontes ambientais de espécies de *Aeromonas* que potencialmente podem levar à infecção ou colonização em humanos. **Fonte:** Modificado de Janda e Abbott, 2010.

Apesar da grande heterogeneidade do gênero, as espécies mais comumente associadas a infecções em humanos são *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* (Ghenghesh *et al.*, 2008). No Brasil, estudos apontam *A. caviae* como a espécie mais prevalente (Pereira *et al.*, 2008; Prediger *et al.*, 2012).

2.4 Métodos fenotípicos para identificação de *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas* em geral é de difícil identificação laboratorial e seu diagnóstico diferencial não é realizado como parte da rotina da maioria dos laboratórios clínicos (Ghenghesh *et al.*, 2008). A elevada variabilidade de características bioquímicas dos membros deste gênero faz com que as técnicas baseadas no fenótipo por vezes levem a resultados ambíguos ou incorretos (Aravena-Roman *et al.*, 2011).

Embora o crescimento em meios de cultura convencionais não seja um problema, a identificação bioquímica de *Aeromonas* spp. é confusa, levando a classificar esse microrganismo em outros gêneros, principalmente, *Vibrio* e *Plesiomonas* (Chacon *et al.*, 2002; Janda e Abbott, 2010; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010). A identificação se torna ainda mais difícil quando se trata da determinação das espécies. Na maioria dos casos, são necessários muitos testes (18 a 24) para diferenciar espécies e ainda assim alguns isolados apresentam perfis atípicos (Abbott *et al.*, 2003). Os sistemas comerciais de identificação tais como API 20E e Vitek, dentre outros, apresentam limitações em diferenciar corretamente as espécies de *Aeromonas*, tendendo a classificar erroneamente grande parte das cepas como *A. hydrophila* (Park *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2003).

A descoberta de novas espécies de *Aeromonas* que não estão contempladas nos esquemas de identificação fenotípica frequentemente utilizados aumenta ainda mais as chances de falsos resultados (Abbott *et al.*, 2003). Por este motivo desde a década de oitenta têm sido desenvolvidas diferentes técnicas baseadas na análise de DNA que tem se mostrado mais estáveis e confiáveis para identificação do gênero e espécies de *Aeromonas*.

2.5 Métodos moleculares para identificação e tipagem de *Aeromonas*

Os genomas completamente sequenciados de quatro espécies de *Aeromonas* encontram-se disponíveis atualmente na base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): *A. hydrophila* (cinco cepas), *A. salmonicida* (uma cepa), *A. veronii* (uma cepa) e *A. media* (uma cepa). O conhecimento detalhado dos genomas de *A. hydrophila* ATCC 7966^T e *A. salmonicida* A449, tem auxiliado no entendimento das propriedades metabólicas dessas bactérias, como elas se adaptam a diferentes ecossistemas e o processo de interação e invasão ao hospedeiro mediado por um grande número de genes de virulência (Seshadri *et al.*, 2006; Reith *et al.* 2008). Entretanto, os genomas mais recentemente sequenciados de *A. veronii* (B565) e *A. media* (WS), trazem apenas informações preliminares, não detalhando genes específicos implicados na virulência e no metabolismo (Li *et al.* 2011; Chai *et al.* 2012). A Tabela 2 compara características de quatro genomas de *Aeromonas*, que são similares em tamanho (4.55 a 4.78 Mb) e lista a presença de plasmídeos, número de genes, proteínas, genes de rRNA e tRNA, pseudogenes, e conteúdo GC.

O genoma de *A. salmonicida* A449 abriga 139 pseudogenes, 88 elementos de inserção e 5 plasmídeos, enquanto que nas cepas *A. hydrophila* ATCC 7966^T, *A. veronii* B565 e *A. media* WS foram observados números menores de pseudogenes (7, 9 e 28, respectivamente). Nenhum elemento de inserção foi verificado na cepa ATCC 7966^T e para as demais esse dado não foi disponibilizado. A cepa *A. media* WS apresentou um pequeno plasmídeo, nas outras cepas não foram verificados plasmídeos. A abundância de elementos de inserção, pseudogenes e plasmídeos em *A. salmonicida* sugere ser resultado da

evolução e adaptação dessas bactérias para infectar peixes (Reith *et al.* 2008). Em contraste, no genoma de *A. hydrophila* ATCC 7966^T foram verificados genes codificadores de várias habilidades metabólicas, o que reflete a versatilidade dessas bactérias para habitar vários ambientes e diversos hospedeiros humanos e animais (Seshadri *et al.*, 2006).

Existe ainda disponíveis no NCBI mais quatro genomas completamente sequenciados de cepas da espécie *A. hydrophila*: 4AK4 (CP006579.1), ML09-119 (CP005966.1), AL09-71 (CP007566.1) e pc104A (CP007576.1). O tamanho do cromossomo dessas cepas varia de 4.53 a 5.02 Mb; número de genes (4272-4577); proteínas (4091-4434); tRNA (111-125); rRNA (28-31); pseudogenes (36-51 e duas cepas com essa informação indisponível) e conteúdo GC (60,8-62%). Descrições a respeito desses genomas estão disponíveis na literatura, entretanto sem muitos detalhes (Gao *et al.* 2013; Tekedar *et al.* 2013; Pridgeon *et al.* 2014a; Pridgeon *et al.* 2014b).

Tabela 2: Características gerais dos genomas completos de quatro espécies de *Aeromonas*.

Características	<i>A. hydrophila</i> (ATCC 7966 ^T)	<i>A. salmonicida</i> (A449)	<i>A. veronii</i> (B565)	<i>A. media</i> (WS)
Tamanho do cromossomo (Mb)	4.74	4.70	4.55	4.78
Nº de genes	4284	4371	4170	4546
Nº de proteínas	4119	4085	4028	4362
Nº de genes de tRNA	128	110	102	126
Nº de genes de rRNA	31	28	31	30
Nº de pseudogenes	7	139	9	28
Nº de elementos de inserção	0	88	ND	ND
Conteúdo GC (%)	61.5	58.5	58.7	60,7
Nº de plasmídeos	0	5	0	1
Número de acesso	CP000462.1	CP000644.1	CP002607.1	CP007567.1

Disponível na base de dados do NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

ND, não-disponível

Para evitar erros na identificação do gênero *Aeromonas*, uma PCR específica tendo como alvo o gene codificador de glicerofosfolipídio-colesterol aciltransferase (GCAT) foi desenvolvida por Chacon *et al.* (2002). Embora raros casos de cepas de *Aeromonas* negativas para esse gene já tenham sido descritos na literatura (Guerra *et al.* 2007; Nawaz *et al.* 2010), o gene *gcat* tem sido utilizado como um marcador para o gênero, diferenciando-o de outras enterobactérias (Puthucheary *et al.*, 2012; Mendes-Marques *et al.*, 2013).

Quando utilizadas para a tipagem molecular de cepas de *Aeromonas*, técnicas como o *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) oferecem resultados satisfatórios na maioria das circunstâncias (Miyata *et al.*, 1995; Huys *et al.*, 1996; Hanninen e Hirvela-Koski, 1999; Figueras *et al.*, 2000; Szczuka e Kaznowski, 2004).

Diante da complexa história taxonômica, estudos polifásicos são indicados para obter resultados conclusivos quanto a determinação das espécies do gênero *Aeromonas* (Janda e Abbott, 2010). O sequenciamento do gene 16S rRNA e mais recentemente de genes *housekeeping* tem sido bastante utilizado para estudos taxonômicos deste gênero (Saavedra *et al.*, 2006; Fontes *et al.*, 2011, Aravena-Roman *et al.*, 2013).

2.5.1 Gene 16S rRNA

A análise da sequência de nucleotídeos do gene 16S rRNA é geralmente aceita como um marcador estável e específico para identificação bacteriana

(Marchandin *et al.*, 2003). Esse gene codifica a menor subunidade de rRNA em procariotos e está organizado juntamente aos outros dois genes de rRNA (5S rRNA e 23S rRNA) em um agrupamento expresso como operon único (Figura 4). O operon de rRNA (*rrn* operon) pode estar presente em um número variando de 1 a 15 cópias nos genomas bacterianos (Coenye e Vandamme, 2003). Em *Aeromonas* foram verificados de 8 a 11 cópias de *rrn* operons no genoma de diversas cepas (Roger *et al.*, 2012a).

Acredita-se que as cópias dos genes de rRNA dentro de um organismo são sujeitas a um processo de homogeneização através de recombinação homóloga, também conhecida como a conversão do gene. O processo de homogeneização pode envolver domínios curtos sem afetar toda a sequência de cada gene (Hashimoto *et al.*, 2003). Diferenças nucleotídicas (chamadas de microheterogeneidades ou polimorfismos) dispersas entre essas cópias do 16S rRNA foram descritas em genomas de diversos gêneros bacterianos (Moreno *et al.*, 2002; Boucher *et al.*, 2004; Vásquez *et al.*, 2005).

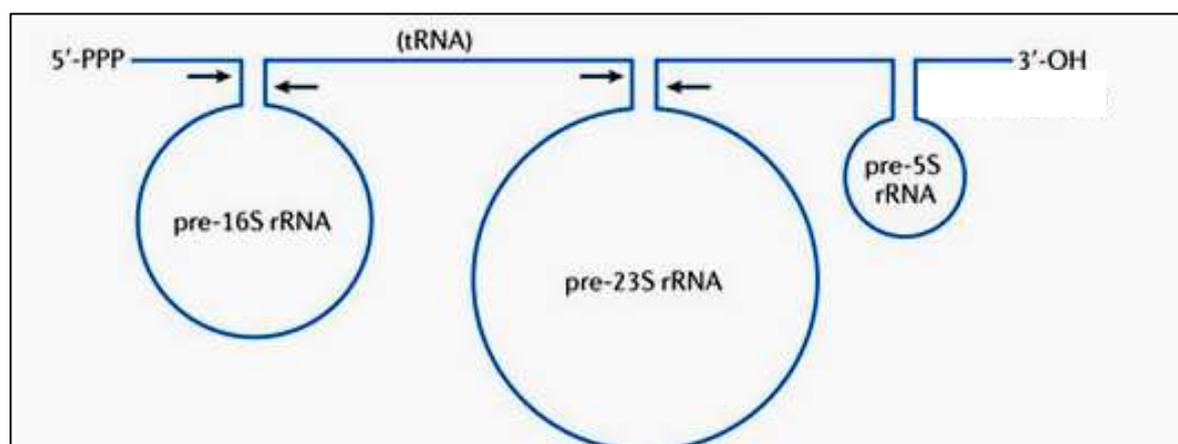


Figura 4: Esquema do *rrn* operon de *Escherichia coli* em processo de transcrição. **Fonte:** Mackie, 2013.

Martínez-Murcia *et al.* (1992a) sequenciaram o gene 16S rRNA de 20 cepas de *Aeromonas* e encontraram uma sequência de 1.503 nucleotídeos representando 98% do gene. Foram encontrados altos níveis de similaridade (96,7 a 100%) entre as cepas, contudo algumas alterações pontuais tornaram possível a diferenciação de cada uma das 12 espécies descritas na época. Estudos posteriores revelaram a presença de distintas microheterogeneidades intragenômicas, principalmente em regiões variáveis do gene 16S rRNA (regiões V2, V3 e V6), que contém as sequências nucleotídicas capazes de discriminar a maioria das espécies de *Aeromonas* (Morandi *et al.*, 2005; Alperi *et al.*, 2008). Roger *et al.* (2012a) estabeleceram padrões de evolução dentro do gênero *Aeromonas* a partir da análise da heterogeneidade, número e distribuição dos *rrn* operons do 16S rRNA em nível intragenômico e intraespecífico.

A porcentagem de microheterogeneidades por sequência do gene 16S rRNA varia de 0,06 a 1,5%. Alguns autores sugerem que baixos níveis de microheterogeneidades não afetam a taxonomia baseada neste gene, enquanto outros autores tem advertido que tal fato pode acarretar a identificação incorreta das espécies (Morandi *et al.*, 2005; Alperi *et al.*, 2008).

Figueras *et al.*, (2000), utilizando o método de RFLP do 16S rRNA, conseguiram produzir um padrão único para as 14 espécies de *Aeromonas* descritas até aquele ano, entretanto alguns isolados produziram padrões atípicos de restrição, devido as microheterogeneidades localizadas nos sítios de restrição das endonucleases utilizadas (*AluI* e *MboI*). Esses e outros motivos tem enfatizado a necessidade de métodos moleculares que possam dar suporte a inferência taxonômica baseada no gene 16S rRNA para espécies de *Aeromonas*.

2.5.2 Genes *housekeeping*

Com advento da genética molecular e do sequenciamento de genomas completos, várias novas oportunidades para estudar o parentesco genético de cepas bacterianas têm sido exploradas (Coenye *et al.*, 2005). Com isso, nos últimos anos, estudos taxonômicos e evolutivos baseados em genes *housekeeping* têm sido cada vez mais relatados, o que tem aumentado ainda mais as potencialidades do sequenciamento. Esses genes além de codificarem proteínas com funções vitais para as células, apresentam outras características que os permitem ser utilizados para filogenia: são genes de cópia única no genoma e que raramente sofrem transferência horizontal; o fato de se tratar de uma sequência que codifica para uma proteína torna a porcentagem de substituição nucleotídica superior à encontrada no gene 16S rRNA, o que o torna útil para o esclarecimento de relações filogenéticas mais próximas (Sawada *et al.*, 1999; Martens *et al.*, 2008). Estudos mostraram que genes *housekeeping* como *gyrB*, *rpoD*, *rpoB* e *recA* são eficientes marcadores moleculares para inferir relações taxonômicas no gênero *Aeromonas* (Kupfer *et al.*, 2006; Alperi *et al.*, 2008; Sepe *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2012) e atualmente o uso desses genes é considerado como padrão ouro para correta identificação de espécies de *Aeromonas* (Figueras *et al.*, 2011b). Mais recentemente a análise de múltiplas sequências concatenadas desses genes (*Multilocus Sequence Analysis* - MLSA), tem sido aplicada para investigação taxonômica do gênero (Alperi *et al.*, 2010b, Martínez-Murcia *et al.*, 2013).

2.5.2.1 Gene *gyrB*

O gene *gyrB*, com aproximadamente 2.415 nucleotídeos, codifica a subunidade β da DNA girase (Figura 5), uma DNA topoisomerase tipo II. As DNA topoisomerasas exercem controle sobre o grau de superenrolamento da molécula de DNA durante processos biológicos essenciais como a replicação, transcrição e recombinação (Huang, 1996).

Estudos filogenéticos utilizando a sequência do gene *gyrB* foram realizados em diferentes gêneros bacterianos e demonstraram que ele é uma alternativa eficiente para identificação e análise taxonômica (Fukushima *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007). Yanez *et al.*, (2003) demonstraram que o sequenciamento deste gene em estudos moleculares com isolados do gênero *Aeromonas* é uma ferramenta adequada para elucidar relações filogenéticas inter-espécies.

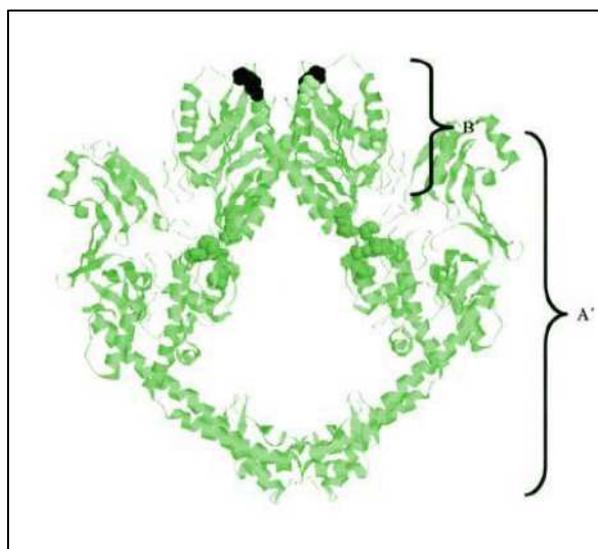


Figura 5: Estrutura da DNA girase. (A): subunidade funcional GyrA; (B): subunidade funcional GyrB. **Fonte:** Heddle e Maxwell, 2002.

2.6 Métodos filogenéticos para identificação e análise populacional de *Aeromonas*

Árvores filogenéticas, particularmente aquelas incluindo todas as espécies pertencentes a um grupo taxonômico maior, fornecem um registro indireto dos eventos de especiação que levaram a existência das espécies atuais (Barracough e Nee; 2001). Um grande número de cronômetros moleculares têm sido utilizados para avaliar as relações filogenéticas entre espécies de *Aeromonas*, entre eles estão os genes 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD*, *rpoB*, *dnaJ* e outros. Essas análises são realizadas a partir de únicos genes ou com base em múltiplas sequências concatenadas (*Multilocus Phylogenetic Analysis* - MLPA) (Roger *et al.*, 2012b; Lóren *et al.*, 2014).

As árvores filogenéticas fornecem as informações sobre relações verticais de ancestrais e descendentes, mas a história evolutiva envolvendo eventos de reticulação (transferência horizontal de genes, recombinação, duplicação gênica e outros) não pode ser representada. Assim surge a necessidade de redes filogenéticas, um tipo de análise que tem merecido destaque no campo da bioinformática (Huson e Bryant, 2006; Gusfield *et al.*, 2007). As redes filogenéticas são utilizadas para esclarecer partes conflitantes das árvores filogenéticas tradicionais (Mathur e Adlakha, 2014). Esse tipo de análise tem sido gerada a partir de informações produzidas por *Multilocus sequence typing* (MLST) dentro de populações bacterianas, usando o algoritmo eBURST (Feil *et al.*, 2004), mas também são aplicadas a partir de sequências de nucleotídeos de únicos genes, inclusive o gene 16S rRNA (Zamborsky e Nishiguchi, 2011; Vos *et al.*, 2012).

O algoritmo eBURST identifica mutuamente grupos exclusivos de genótipos relacionados em uma população, tentando identificar entre eles o genótipo fundador e sua descendência e além disso simplifica o problema de representar a relação evolutiva entre genótipos estreitamente relacionados (Feil *et al.*, 2004; Spratt *et al.*, 2004). Para o gênero *Aeromonas* são escassos os estudos utilizando redes filogenéticas. A diversidade genética entre duas populações de *Aeromonas* foi analisada por Martino *et al.* (2011) e Roger *et al.* (2012b), usando o algoritmo eBURST, a partir de dados de MLST. Os autores verificaram perfis clonais dentro das populações e um modelo de evolução envolvendo muitos eventos de recombinação.

2.7 Tratamento e perfil de sensibilidade a antimicrobianos

No tratamento de infecções por *Aeromonas*, aconselha-se, como primeira escolha, as fluoroquinolonas, e como alternativa o sulfametoxazol-trimetoprima, aminoglicosídeos, carbapenens, cefalosporinas de segunda e terceira geração, e as tetraciclina (Overman e Janda, 1999; Vila *et al.*, 2003; Otaviani *et al.*, 2006). A realização de testes de sensibilidade a antimicrobianos de isolados locais é necessária para detectar padrões relacionados as espécies, e também porque a sensibilidade pode variar de uma região geográfica à outra (Horneman *et al.*, 2007).

A sensibilidade a antimicrobianos em isolados clínicos de *Aeromonas* spp. tem sido bastante estudada. De uma forma geral admite-se que os indivíduos deste gênero são resistentes à penicilina, ampicilina (exceto *A. trota*) e carbenicilina (Ceylana *et al.*, 2003; Vila *et al.*, 2003; Vivekanandhana *et al.*, 2005).

O aumento da resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos tem sido detectado pela presença de genes de β -lactamases em isolados de *Aeromonas* (Ndi e Barton, 2011; Carvalho *et al.*, 2012; Vega-Sánchez *et al.*, 2014). Relatos de cepas de *Aeromonas* multirresistentes também já foram descritos na literatura (Qu *et al.*, 2005; Gordon *et al.*, 2008; Libisch *et al.*, 2008).

2.8 Mecanismos de virulência e patogenicidade

O avanço das técnicas de biologia molecular tem revelado cada vez mais espécies de *Aeromonas* relacionadas à diarreia e acredita-se que subconjuntos intraspecíficos de cepas de *Aeromonas* apresentem potencial capacidade de causar essas infecções (von Graevenitz, 2007). Na maioria dos casos onde *Aeromonas* spp. é tida como agente etiológico, a diarreia é bastante aquosa e pode vir acompanhada de dor abdominal, vômitos, e febre. A presença de sangue e muco nas fezes também já foi relatada. Geralmente a diarreia é autolimitada e após alguns episódios, o indivíduo acometido apresenta melhora do quadro clínico, contudo, em casos mais graves, o quadro pode evoluir para desidratação severa (Ghenghesh *et al.*, 2008).

Diarreia associada a *Aeromonas* tem sido relatada mundialmente, acometendo todas as faixas etárias e ocorrendo tanto em pessoas saudáveis, como em pessoas com algum distúrbio imunológico (Janda e Abott, 2010). Nos últimos anos as gastroenterites têm sido as manifestações clínicas mais comumente relacionadas a infecções por *Aeromonas* e relatos detalhados de casos e estudos epidemiológicos de caso-controle tem sido descritos (Albert, *et al.*, 2000; Pablos *et al.*, 2010; Senderovich *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014). Apesar

disso, a exata incidência dessas infecções em âmbito global é desconhecida devido a subdetecção e/ou subnotificação de muitos casos.

A patogenicidade de *Aeromonas* spp. envolve um grande grupo de fatores de virulência, entre eles hemolisinas, enterotoxinas, flagelinas, lipases, leucocidinas, DNases adesinas, cuja funções não são conclusivamente estabelecidas para nenhuma das infecções humanas por *Aeromonas*. Assim como para outras bactérias, parece que apenas certos subgrupos intraespecíficos de cepas atuam como patógenos humanos (Joseph e Carnahan, 2000; Von Graevenitz, 2007). Apesar de produzirem fatores de virulência similares aos de bactérias que comprovadamente causam diarreia, a incapacidade de distinguir claramente os isolados "infecciosos" dos "colonizadores" do trato gastrointestinal, bem como a falta de um modelo animal para reproduzir os sintomas observados em humanos, dificultam a elucidação da patogenicidade de *Aeromonas* (Janda e Abbott, 2010).

Após se fixar no trato gastrointestinal, *Aeromonas* aparentemente pode causar diarreia devido à produção e liberação de moléculas enterotoxigênicas. Uma das mais conhecidas e bem caracterizadas toxinas, a HlyA pertence a família das β -hemolisinas e apresenta significativa similaridade com a sequência de aminoácidos de HlyA de *Vibrio cholerae* (Wong *et al.*, 1998). Ela é uma enterotoxina citotóxica formadora de poros, que altera a permeabilidade das células intestinais, causando diarreia inflamatória. O gene *hlyA* é amplamente disperso em espécies de *Aeromonas* principalmente em *A. hydrophila* (Heuzenroeder *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003).

Pelo menos duas toxinas citotônicas já foram identificadas em *Aeromonas*, uma enterotoxina termolábil e outra enterotoxina termoestável designadas como

Alt e Ast, respectivamente (Chopra, *et al.*, 1994). Ambas consistem em cadeias polipeptídicas individuais, e não se relacionam as toxinas coléricas. A presença dessas enterotoxinas causaram elevação dos níveis de Monofosfato Cíclico de Adenosina (cAMP) e prostaglandinas nas células do epitélio intestinal, provocando hipersecreção de água e eletrólitos na alças intestinais de camundongos (Chopra *et al.*, 1996; Sha, *et al.*, 2002). Os resultados dos estudos de Albert *et al.*, (2000) realizados em isolados de *Aeromonas* de crianças com diarreia, sugerem que o produto dos genes *alt* e *ast* podem agir sinergicamente para induzir a diarreia aquosa grave, enquanto os isolados positivos apenas para o gene *alt* estão associados a diarreia com fezes moles.

Outros importantes fatores que podem contribuir com a virulência relacionada à diarreia são as flagelinas A e B, que participam da formação do flagelo polar de *Aeromonas*, essencial para a colonização intestinal (Gavín *et al.*, 2002; Merino *et al.*, 2006). As lipases e DNases extracelulares atuam na manutenção e disseminação da bactéria, interferindo na resposta imunológica do hospedeiro (Pemberton *et al.*, 1997; Brinkmann *et al.*, 2004). A aerolisina (AerA) outra toxina citotóxica, que possui atividade hemolítica, sendo o fator de virulência mais bem estudado em *Aeromonas*. Estudos realizados por Heuzenroeder *et al.* (1999) e Wang *et al.* (2003) determinaram que todas as cepas virulentas de *A. hydrophila* foram positivas para os genes *aerA* e *hlyA*, sugerindo que esses genes atuam de forma sinérgica.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Realizar uma caracterização molecular de isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* spp. obtidos durante um surto de diarreia no estado de Pernambuco.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a prevalência das espécies de *Aeromonas* entre isolados clínicos e ambientais obtidos de um surto de diarreia no estado de Pernambuco;
- Comparar os métodos estudados para estabelecer o mais viável para identificação das espécies de *Aeromonas*;
- Pesquisar a estrutura genética da população de *Aeromonas* spp.
- Avaliar o potencial de virulência nos isolados de *Aeromonas* spp;
- Analisar a distribuição e características dos isolados de *Aeromonas* spp. nas diferentes áreas do município de São Bento do Una, Pernambuco.

4. Material e Métodos

4.1 Isolados bacterianos e extração de DNA

Os 119 isolados de *Aeromonas* utilizados nesse estudo foram gentilmente cedidos pelo Dr. Ernesto Hofer, do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos/Fiocruz. Estes isolados foram previamente identificados em nível de gênero e espécie por testes fenotípicos (Hofer *et al.*, 2006) e parte deles (77 isolados) foram também tipados em nível de espécie pelo RFLP do 16S rRNA pela Dra. Maria Jose Figueras da Universidade Rovira i Virgili, Tarragona, Espanha (Mendes-Marques *et al.*, 2012).

Um total de 103 destes isolados foi proveniente de fezes de pacientes envolvidos em um surto de diarreia ocorrido em 2004 no município de São Bento do Una, situado no estado de Pernambuco. Além dos isolados clínicos, foram analisados 16 isolados de *Aeromonas* de ambientes aquáticos, também obtidos durante o período do surto. Os isolados clínicos foram identificados por números que variam de 251 a 374 e os isolados ambientais foram identificados por números a partir de 420. As cepas de referência *A. hydrophila* ATCC 7966^T, *A. veronii* ATCC 35624^T e *A. caviae* ATCC 15468^T foram utilizadas como controles.

Para a preservação do material genético, os isolados estavam estocados a -80°C em BHI com 25% de glicerol e foram recuperados pelo enriquecimento em BHI a 37°C, durante 24h. Duzentos microlitros da cultura foram transferidos para outro tubo de BHI e incubados a 37°C por 24h. Um mililitro da suspensão bacteriana foi utilizado para extração do DNA seguindo o protocolo descrito por Ausubel *et al.* (1987), com algumas modificações descritas por Leal *et al.* (2004).

4.2 Amplificação e sequenciamento dos genes 16S rRNA e *gyrB*

Para a amplificação e sequenciamento dos genes 16S rRNA e *gyrB* dos 119 isolados e três cepas de referência de *Aeromonas* (controles) foram utilizados os *primers* descritos na Tabela 3. Os pares de *primers* 16SrRNAF-16SrRNAR e *gyrB*3F-*gyrB*14R (Borrell *et al.*, 1997; Yanez *et al.* 2003) foram utilizados para amplificar fragmentos de aproximadamente 1500 pb para o 16S rRNA e 1100 pb para *gyrB*. As reações foram preparadas para um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 200 mM; 20 pmol de cada *primer*, 20 ng de DNA genômico de cada isolado; 1U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, WI). As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos repetitivos com desnaturação a 94°C por 1 minuto; a nelamento a temperatura ótima dos *primers* (56°C para 16S rRNA e 55°C para *gyrB*) por 1 minuto e extensão do fragmento a 72°C por 1 minuto. Uma etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. Cepas de referência *A. hydrophila* ATCC 7966^T, *A. veronii* ATCC 35624^T e *A. caviae* ATCC 15468^T foram utilizadas como controles positivos e controle negativo livre de DNA foi incluído em todas as reações.

As amplificações foram realizadas em um termociclador Mastercycler (Eppendorf, Foster City, CA) e alíquotas das reações foram analisadas em gel de agarose 1%, corado com 10 µl de SYBR® Safe (10,000x em DMSO; Invitrogen, Brasil) com tensão de 120 V, durante uma hora. O gel foi visualizado em UV e fotografado com câmera digital Kodak, utilizando o programa Kodak 1D Image Analysis Software, versão 3.5 para Windows (Eastman Kodak Co., New Haven,

CT). O DNA ladder 100 pares de bases (Invitrogen, Brasil) foi utilizado como marcador de peso molecular. Os produtos de PCR desses genes foram purificados usando o reagente ExoSAP-IT PCR Cleanup (Affymetrix, Cleveland, OH) para sequenciamento. Este foi realizado no sequenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA), com os mesmos *primers* utilizados para a amplificação, além de *primers* internos, mostrados na Tabela 3. Todos os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen, Brasil. Cada sequência de nucleotídeos foi determinada pelo menos duas vezes para confirmar as leituras e resolver possíveis ambiguidades. A montagem e edição das sequências foram realizadas utilizando as ferramentas Pregap4 e Gap4 do pacote Staden (Staden *et al.*, 2000).

Tabela 3: Sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes analisados neste estudo.

PRIMER	SEQUENCIA (5'-3')	REFERÊNCIA
Filogenia		
Primers externos		
16SrRNAF	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	Borrell <i>et al.</i> , 1997
16SrRNAR	GGTTACCTTGTTACGACTT	Borrell <i>et al.</i> , 1997
<i>gyrB</i> 3F	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	Yáñez <i>et al.</i> 2003
<i>gyrB</i> 14R	TTGTCCGGGTTGTACTCGTC	Yáñez <i>et al.</i> 2003
Primers internos		
16SBF	AGCAGTGGGGAATATTGCAC	Deste estudo
16SBR	GGCAACAAAGGACAGGGGT	Deste estudo
16SCF	ACGCAGGCGGTTGGATAAGT	Deste estudo
16SCR	AAATCGACATCGTTTACGGCG	Deste estudo
16SDF	AACCTTACCTGGCCTTGACA	Deste estudo
16SDR	CACACACGCGGCATGGTGCATC	Deste estudo
<i>gyrB</i> 9Rs	CCTTGACCGAAATGACCGCC	Yáñez <i>et al.</i> 2003
<i>gyrB</i> 7F	GGGGTCTACTGCTTCACCAA	Yáñez <i>et al.</i> 2003
<i>gyrB</i> 9R	ACCTTGACGGAGATAACGGC	Yáñez <i>et al.</i> 2003
Genes de virulência		
<i>hlyAF</i>	GGCCGGTGGCCCCGAAGATACGGG	Heuzenroeder <i>et al.</i> 1999
<i>hlyAR</i>	GGCGGCGCCGGACGAGACGGG	Heuzenroeder <i>et al.</i> 1999
<i>altF</i>	CCATCCCCAGCCTTTACGCCAT	Martínez <i>et al.</i> 2009
<i>altR</i>	TTTCACCGAGGTGACGCCGT	Martínez <i>et al.</i> 2009
<i>astF</i>	ATGCACGCACGTACCGCCAT	Martínez <i>et al.</i> 2009
<i>astR</i>	ATCCGGTCGTCGCTCTTGGT	Martínez <i>et al.</i> 2009

4.3 Análise filogenética dos genes 16S rRNA e *gyrB*

Para a análise filogenética, além das sequências dos 16S rRNA e *gyrB* dos 119 isolados de *Aeromonas* e das cepas de referência (*A. hydrophila* ATCC 7966^T, *A. veronii* ATCC 35624^T e *A. caviae* ATCC 15468^T), foram utilizadas sequências de outras 23 cepas de referência das demais espécies de *Aeromonas* publicadas até o momento e da cepa *Salmonella enterica* ATCC 13311^T (grupo externo), obtidas na base de dados do GenBank/NCBI (número de acesso de todas as sequências utilizadas estão disponíveis no Anexo A). A cepa *Salmonella enterica* ATCC 13311^T, foi escolhida como grupo externo, pois apesar de pertencer a outro grupo taxonômico, apresenta relações filogenéticas próximas ao gênero *Aeromonas*.

Foram utilizadas sequências de 1454 e 920 pb dos genes 16S rRNA e *gyrB*, respectivamente, tendo em vista que esses foram os tamanhos máximos obtidos igualmente para todas as cepas de referência de *Aeromonas* disponíveis no GenBank. Com base na observação do genoma completo da cepa *A. hydrophila* ATCC 7966^T (número de acesso no GenBank CP000462-1), o fragmento de 1454 pb situa-se da posição 21 à 1475 da sequência total do gene 16S rRNA. Já o fragmento de 920 pb, situa-se da posição 448 a 1367 pb e corresponde a aproximadamente 70% do domínio ATPase da sequência total do gene *gyrB*. Esse estudo não incluiu a espécie *A. australiensis* recentemente publicada por Aravena-Román *et al.* (2013), devido a indisponibilidade de sequências com tamanhos compatíveis para essas análises.

As sequências de nucleotídeos dos genes 16S rRNA e *gyrB* foram alinhadas separadamente e concatenadas (2374 pb) utilizando o programa

Muscle (Edgar, 2004). As estimativas de divergência evolutiva e os agrupamentos foram obtidos usando o modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) e as árvores filogenéticas foram construídas pelo método de *neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987), disponível no programa MEGA, versão 5 (Tamura *et al.*, 2011). A estabilidade das relações foi acessada pelo *bootstrap* (1000 replicatas). As sequências de nucleotídeos do gene *gyrB* foram traduzidas em sequências de aminoácidos (306 aa) utilizando ferramentas do programa Mega 5. A distância genética foi computada usando o método de correção de Poisson (Nei e Kumar, 2000) e uma árvore filogenética foi gerada utilizando o método de *neighbor-joining*, no MEGA 5.

Além das posições na árvore filogenética, o valor de *cut-off* de 97% de identidade foi utilizado para considerar os isolados pertencentes a uma mesma espécie, com base nas sequências do gene *gyrB* (Yanez *et al.*, 2003). Para o gene 16S rRNA não existe na literatura um valor de *cut-off* estabelecido para identificação de espécies de *Aeromonas*. Os resultados da análise filogenética dos genes 16S rRNA e *gyrB* para a identificação das espécies de *Aeromonas* foram comparados com aqueles previamente obtidos pelos testes fenotípicos e pelo RFLP do 16S rRNA (Hofer *et al.*, 2006; Mendes-Marques *et al.*, 2012) a fim de verificar a concordância entre esses métodos.

4.4 Rede filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA

Para avaliar a relação ancestral-descendentes entre os genótipos dos 119 isolados e 26 cepas de referência de *Aeromonas*, foi construída uma rede

filogenética baseada em dados das sequências do gene 16S rRNA (1454 pb), utilizando o programa eBURST, versão 3 (Feil *et al.* 2004; Spratt *et al.* 2004).

Para executar o eBURST, primeiramente foram separadas a partir do alinhamento das sequências, todas as colunas contendo sítios polimórficos, obtendo-se um número N de pares de bases para as 145 sequências analisadas. A partir dessas sequências de sítios polimórficos foi gerada uma matriz, com os números de 1 a 4 representando no alinhamento as bases Adenina, Citosina, Timina e Guanina, respectivamente. Essa matriz foi utilizada como entrada para o programa eBURST.

A rede filogenética foi definida como um grupo de genótipos estreitamente relacionados, cada um compartilhando um número N-1 de bases idênticas com pelo menos outro membro da rede, sendo todos descendentes de um genótipo fundador. Essa definição foi feita com base no padrão utilizado pelo programa. A estabilidade das relações foi acessada pelo *bootstrap* (1000 replicatas). O algoritmo eBURST considera como genótipo fundador primário da população aquele que apresenta o maior número de variantes descendentes (Feil *et al.* 2004; Spratt *et al.* 2004).

4.5 Detecção de genes de virulência

A presença de fragmentos dos genes de virulência *hlyA* (597 pb), *ast* (260 pb) e *alt* (338 pb) nos 119 isolados de *Aeromonas* foi verificada por PCR, utilizando *primers* já descritos na literatura (Tabela 3). As reações foram preparadas conforme descrito no tópico 4.2 para amplificação dos genes 16S rRNA e *gyrB*. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação

inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos repetitivos com desnaturação a 94°C por 1 minuto; anelamento a temperatura ótima dos *primers* (62°C para *hlyA*, 63°C para *alt* e 66°C para *ast*) por 1 minuto e extensão do fragmento a 72°C por 1 minuto. Uma etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos. Controle negativo livre de DNA foi incluído em todas as reações e o DNA da cepa *A. hydrophila* ATCC 7966^T foi utilizado como controle positivo, porque possui os três genes citados. As reações de amplificação foram repetidas no mínimo duas vezes para confirmação dos resultados. As demais informações de amplificação e visualização dos produtos de PCR podem ser verificadas no tópico 4.2.

Os produtos das reações de PCR dos genes de virulência pesquisados na cepa de referência *A. hydrophila* ATCC 7966^T e em três isolados representantes do surto foram purificados com o reagente ExoSAP-IT PCR Cleanup e enviados em duplicata para sequenciamento em ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, utilizando os mesmos primers usados para a amplificação desses genes. As sequências foram submetidas ao alinhamento através do programa BLASTn do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para confirmação da identidade dos fragmentos amplificados.

A presença dos genes de virulência (*aerA*, *exu*, *lip* e *flaA/B*) pesquisados por Mendes-Marques *et al.* (2012) entre os mesmos isolados de *Aeromonas* deste estudo, foi somada a presença dos genes *hlyA*, *ast* e *alt*. A análise das possíveis combinações entre esses sete genes foi realizada para obter informações mais detalhadas sobre o potencial de virulência das espécies identificadas.

4.6 Distribuição dos isolados de *Aeromonas* nas áreas urbanas e rurais do município de São Bento do Una, Pernambuco

As coordenadas geográficas de Graus, Minutos e Segundos – GMS (Anexo B) referentes ao local de residência dos pacientes dos quais foram obtidos 48 isolados clínicos de *Aeromonas*, foram utilizadas para verificação da distribuição das espécies e características dos isolados, no município de São Bento do Una. O número de isolados utilizados nessa análise é uma amostragem representativa (48/103; 46,6%) do número total de isolados clínicos utilizado nesse estudo. As coordenadas GMS de latitude e longitude foram convertidas para graus decimais através da planilha no formato Excel, disponível em: <http://www.processamentodigital.com.br/excel-2010-conversao-de-coordenadas-coordenadas-geograficas-de-graus-minutos-e-segundos-para-graus-decimais/>.

Após a conversão desses dados, foram gerados mapas mostrando a distribuição dos isolados/pacientes no município de São Bento do Una, utilizando o software ArcMap, do Sistema de Informação Geográfica, ArcGIS (Environmental Systems Research Institute, Redlands, CA). Os mapas gerados foram analisados e a distribuição dos isolados foi associada com dados sobre espécies, genótipos e perfis de virulência.

5. Resultados

5.1 Análise filogenética do gene 16S rRNA

A análise das sequências do gene 16S rRNA (1.454 pb) dos 119 isolados de *Aeromonas*, obtidos durante o surto de diarreia em São Bento do Una e 26 cepas de referência de espécies do gênero, demonstrou um alto nível de identidade, variando de 96,6 a 100% (de 0 a ~49 pb diferentes). Na análise intra-espécies a taxa média de divergência entre as sequências foi aproximadamente 0,2% (~3 pb), variando de zero a 0,5%. Na análise inter-espécies houve uma taxa de divergência nucleotídica variando de zero (*A. bestiarum* e *A. piscicola*) a 3,4% (*A. simiae* e *A. bestiarum*; *A. simiae* e *A. piscicola*), com taxa média de divergência de aproximadamente 2,2% (~32 pb). A sequência da cepa *Salmonella enterica* ATCC 13311^T (grupo externo) teve uma divergência sempre acima de 10%, quando comparada as espécies de *Aeromonas*.

As variações nucleotídicas que diferenciaram a maioria das espécies de *Aeromonas* a partir do gene 16S rRNA estavam localizadas principalmente na posição 457 a 476 pb. As cepas *A. caviae* ATCC 15468^T, *A. veronii* ATCC 35624^T e *A. hydrophila* ATCC 7966^T (controles) apresentaram a mesma sequência de nucleotídeos para o gene 16S rRNA que as depositadas no NCBI (NR_029252.1, NR_119045.1 e CP000462.1, respectivamente).

A árvore filogenética derivada das sequências do gene 16S rRNA mostrando a relação entre os 119 isolados e 26 sequências de cepas de referência de *Aeromonas*, mais a cepa de referência de *S. enterica*, está representada na Figura 6.

Na árvore filogenética foi observado que 91 isolados (91/119; 76,5%) se posicionaram em um grande grupo que abrigou cepas de referência de cinco espécies. Nesse grupo, 49 isolados (49/119; 41,2%) agruparam com a cepa de referência de *A. caviae*, 11 isolados (11/119; 9,2%) agruparam com a cepa de referência de *A. aquariorum*, um isolado (1/119; 0,8%) agrupou com as cepas de referência de *A. sanarellii/A. taiwanensis* e 4 isolados (4/119; 3,4%) agruparam com a cepa de referência de *A. trota*, formando subgrupos bem definidos. Os outros 26 isolados (26/119; 21,9%) não agruparam claramente com nenhuma dessas cepas de referência.

Além desse grupo mais relacionado, quatro isolados (4/119; 3,4%) agruparam com a cepa de referência de *A. hydrophila*; três (3/119; 2,5%) com *A. jandaei*; nove (9/119; 7,6%) com *A. veronii* e um (1/119; 0,8%) com *A. fluvialis*. Essas espécies se posicionaram em ramos independentes na árvore filogenética. Onze isolados (11/119; 9,2%) se posicionaram em grupo ou isoladamente em ramos diferentes da árvore, que não abrigaram nenhuma das cepas de referência de espécies de *Aeromonas*, esses isolados foram: 593, 316, 289, 317, 253, 359, 272, 270, 287, 279 e 285. Pode ser observado também que muitos nós da árvore filogenética apresentaram valores de *bootstrap* menores que 50.

A análise dos cromatogramas das sequências do gene 16S rRNA revelou a existência de microheterogeneidades intragenômicas em isolados de todas as espécies identificadas. Duplos sinais visualizados em certas posições nos cromatogramas confirmaram a presença dessas microheterogeneidades. Esses sinais secundários foram reproduzíveis em experimentos independentes. A maioria dessas microheterogeneidades foram transições (purina-purina ou pirimidina-pirimidina). Todas as espécies identificadas nesse estudo

apresentaram microheterogeneidades nas posições 1011 e 1018 da sequência do gene 16S rRNA, ocorrendo inclusive na maioria dos isolados.

A Figura 7 mostra um exemplo de como essas microheterogeneidades foram identificadas nos cromatogramas e no alinhamento das sequências. Nesse exemplo o isolado 279 que por sua posição na árvore, não pôde conclusivamente ser classificado como *A. veronii*, mas que se mostrou bastante relacionado a ela, apresentou algumas microheterogeneidades quando comparado à espécie.

Fazendo uma análise das relações evolutivas entre todas as espécies de *Aeromonas* na árvore filogenética baseada no 16S rRNA, algumas observações foram feitas: além da estreita relação entre as espécies *A. caviae*, *A. aquariorum*, *A. trota*, *A. sanarellii* e *A. taiwanensis*, citada acima, também foi observada relação evolutiva muito próxima entre *A. hydrophila* e *A. media*. As espécies *A. allosaccharophila*, *A. rivuli*, *A. sobria*, *A. popoffi*, *A. bivalvium*, *A. tecta*, *A. eucrenophila*, *A. encheleia*, *A. molluscorum*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum* e *A. piscicola*, também aparecem ligadas por um ramo principal. Os pares *A. veronii* - *A. fluvialis* e *A. schubertii* - *A. diversa*, também demonstraram estreita relação na árvore. *A. bestiarum* e *A. piscicola* foram as únicas espécies que na árvore apareceram em mesma linha evolutiva.

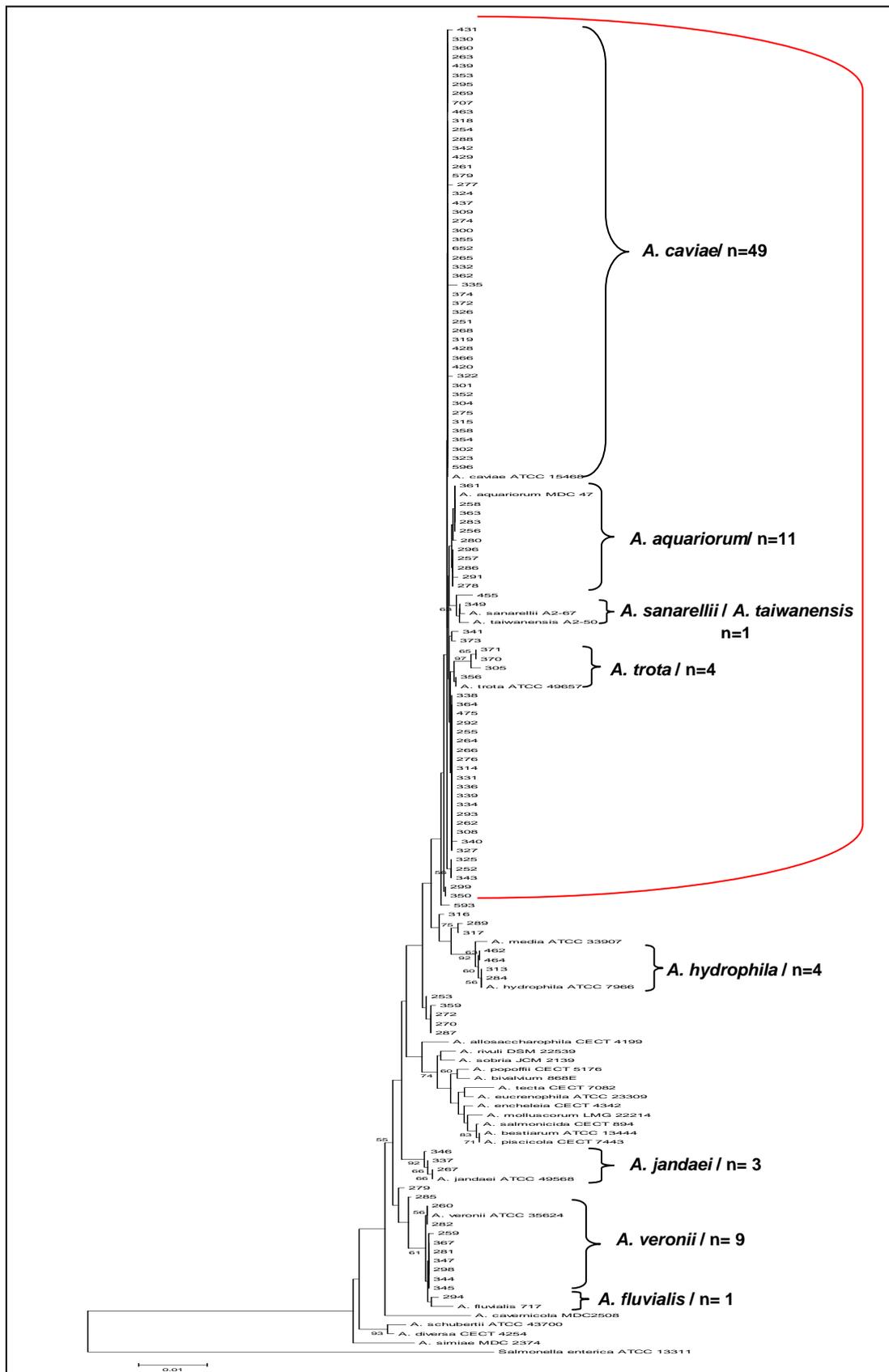


Figura 6: Árvore filogenética (*neighbor-joining*) derivada de sequências do gene 16S rRNA (1454 pb). Relação entre 119 isolados de *Aeromonas* e 26 conhecidas espécies do gênero, além de um grupo externo representado pelo gênero *Salmonella*. Números próximos aos nós indicam os valores de *bootstrap* ≥ 50 (porcentagem de 1000 replicatas). Destaque em vermelho para o grupo de 91 isolados e cinco cepas de referência estreitamente relacionados.

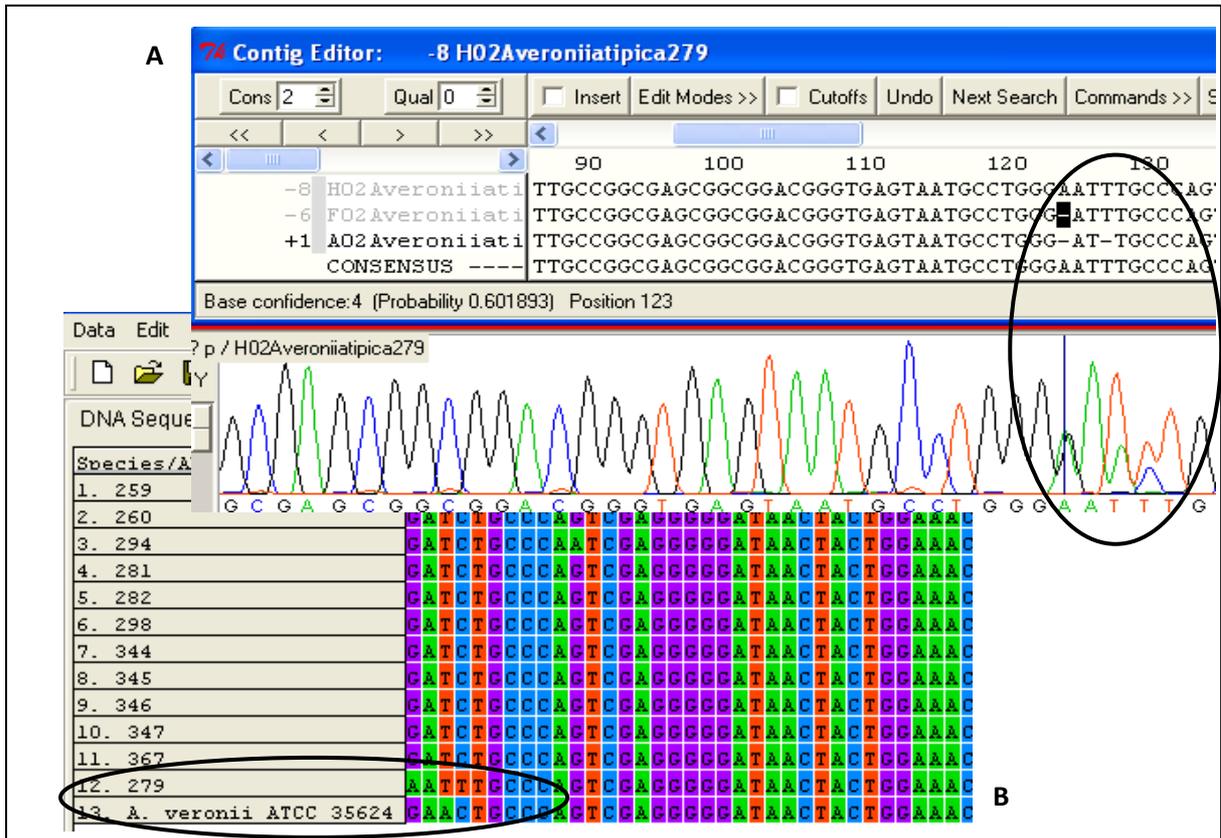


Figura 7: Identificação de microheterogeneidades intragenômicas na sequência do gene 16S rRNA. **A:** Cromatograma gerado a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA do isolado clínico 279, visualizado pelo programa Gap4. **B:** Alinhamento das sequências do 16S rRNA de isolados de *Aeromonas*, visualizado pelo programa Mega 5. Circulos pretos destacando duplos sinais no cromatograma e suas respectivas localizações no alinhamento.

5.2 Análise filogenética do gene *gyrB*

A análise das sequências do gene *gyrB* (920 pb) revelou uma taxa de substituição nucleotídica elevada, tanto em nível intraespecífico, como interespecífico. O nível de identidade entre as sequências dos 119 isolados e das 26 cepas de referência de *Aeromonas* variou em torno de 83 a 100%, compreendendo aproximadamente de zero a 156 pares de base diferentes.

Na análise intra-espécies, a taxa de substituição nucleotídica variou de zero a 2,9%, sendo frequentemente abaixo de 2%, com média geral de divergência entre as sequências em torno de 1,8% (~16 pb). Na análise inter-espécies, a taxa de substituição nucleotídica foi usualmente maior que 3%, exceto para os pares *A. piscicola* e *A. bestiarum* (2,4%) e *A. salmonicida* e *A. bestiarum* (2,7%). O par que apresentou maior divergência foi *A. cavernicola* e *A. schubertii* (17%). A taxa de divergência média entre as espécies foi de aproximadamente 10% (~92 pb). A cepa de referência *Salmonella enterica* ATCC 13311^T (grupo externo) apresentou taxas de divergência sempre acima de 26% quando comparada com as espécies de *Aeromonas*.

As variações nucleotídicas que diferenciaram as espécies de *Aeromonas* estavam localizadas ao longo da sequência do gene *gyrB* e não em uma região determinada. As cepas *A. caviae* ATCCC 15468^T, *A. veronii* ATCC 35624^T e *A. hydrophila* ATCC 7966^T (controles), apresentaram a mesma sequência de nucleotídeos para o gene *gyrB* que as depositadas no NCBI (AJ868400.1, AF417626.1 e CP000462.1, respectivamente).

A árvore filogenética construída a partir do alinhamento das sequências do gene *gyrB* é apresentada na Figura 8. Os isolados agruparam com seis espécies

do gênero *Aeromonas*: *A. caviae* (79/119; 66,4%); *A. aquariorum* (11/119; 9,2%); *A. veronii* (7/119, 5,9%); *A. hydrophila* (4/119; 3,4%); *A. trota* (4/119; 3,4%) e *A. jandaei* (2/119; 1,7%). Os isolados 593, 294, 272, 285, 253, 270, 359, 345, 287, 260, 279 e 347 (12/119; 10%) não agruparam claramente com nenhuma das cepas de referência. Com exceção dos isolados 593 e 294, os outros dez isolados apresentaram valores maiores que 97% de identidade com *A. veronii*. O isolado 593 mostrou maior identidade com a espécie *A. caviae*, 96,5% (~32 pb diferentes), já o isolado 294 mostrou maior identidade com *A. veronii*, 94,5% (~51 pb diferentes).

Algumas divergências na classificação das espécies foram observadas entre as árvores filogenética baseadas nos genes 16S rRNA e *gyrB*: o isolado 349 que pelo 16S rRNA tinha agrupado com as cepas de referência de *A. sanarelli* / *A. taiwanensis*, pelo *gyrB* agrupou com *A. caviae*; o isolado 346 pelo 16S rRNA agrupou com *A. jandaei*, pelo *gyrB* agrupou com *A. veronii*; e o isolado 294 que pelo 16S rRNA agrupou com *A. fluvialis*, pelo *gyrB* não agrupou com nenhuma das espécies.

Todas as espécies se posicionaram em ramos independentes na árvore e a maioria dos nós apresentou valores de *bootstrap* acima de 50. Na análise das relações evolutivas entre todas as espécies de *Aeromonas* observadas na árvore filogenética foi verificado, que a espécie *A. bivalvium* mostrou-se estreitamente relacionada ao complexo *A. caviae*, *A. sanarelli* e *A. taiwanensis*. Também foi observada a estreita relação entre *A. aquariorum* e *A. trota*. Outro grupo de espécies que aparecem relacionadas na árvore filogenética é composto por *A. jandaei*, *A. veronni*, *A. allosaccharophila* e *A. fluvialis*. As espécies *A. cavernicola*, *A. sobria*, *A. molluscorum*, *A. rivuli*, *A. eucrenophila*, *A. tecta*, *A. encheleia*, *A.*

salmonicida, *A. piscicola*, *A. bestiarum*, e *A. popoffi*, ligadas por um ramo principal. Por fim verificamos a estreita relação entre as espécies *A. simiae*, *A. diversa* e *A. schubertii*.

Traduzindo a sequência de nucleotídeos em sequências de aminoácidos (aa), foi observado um alto nível de conservação intra e inter-espécies, assim, diferentes sequências de nucleotídeos frequentemente codificaram sequências de aminoácidos quase ou totalmente idênticas. Consequentemente, cepas de espécies diferentes apareceram em mesmo ramo filogenético e os valores de *bootstrap* foram, em muitos casos, menores que 50 (Figura 9). Analisando as sequências de aminoácidos, os 79 isolados de *A. caviae* apresentaram sequências idênticas, assim como os quatro isolados de *A. hydrophila*, dois de *A. jandaei* e sete isolados de *A. veronii*. Isolados das espécies *A. trota* e *A. aquariorum*, apareceram intermisturados num mesmo ramo filogenético representado por mesma sequência de aminoácidos. Doze isolados (593, 359, 347, 345, 287, 285, 279, 272, 270, 260, 253 e 294) não agruparam com nenhuma das espécies.

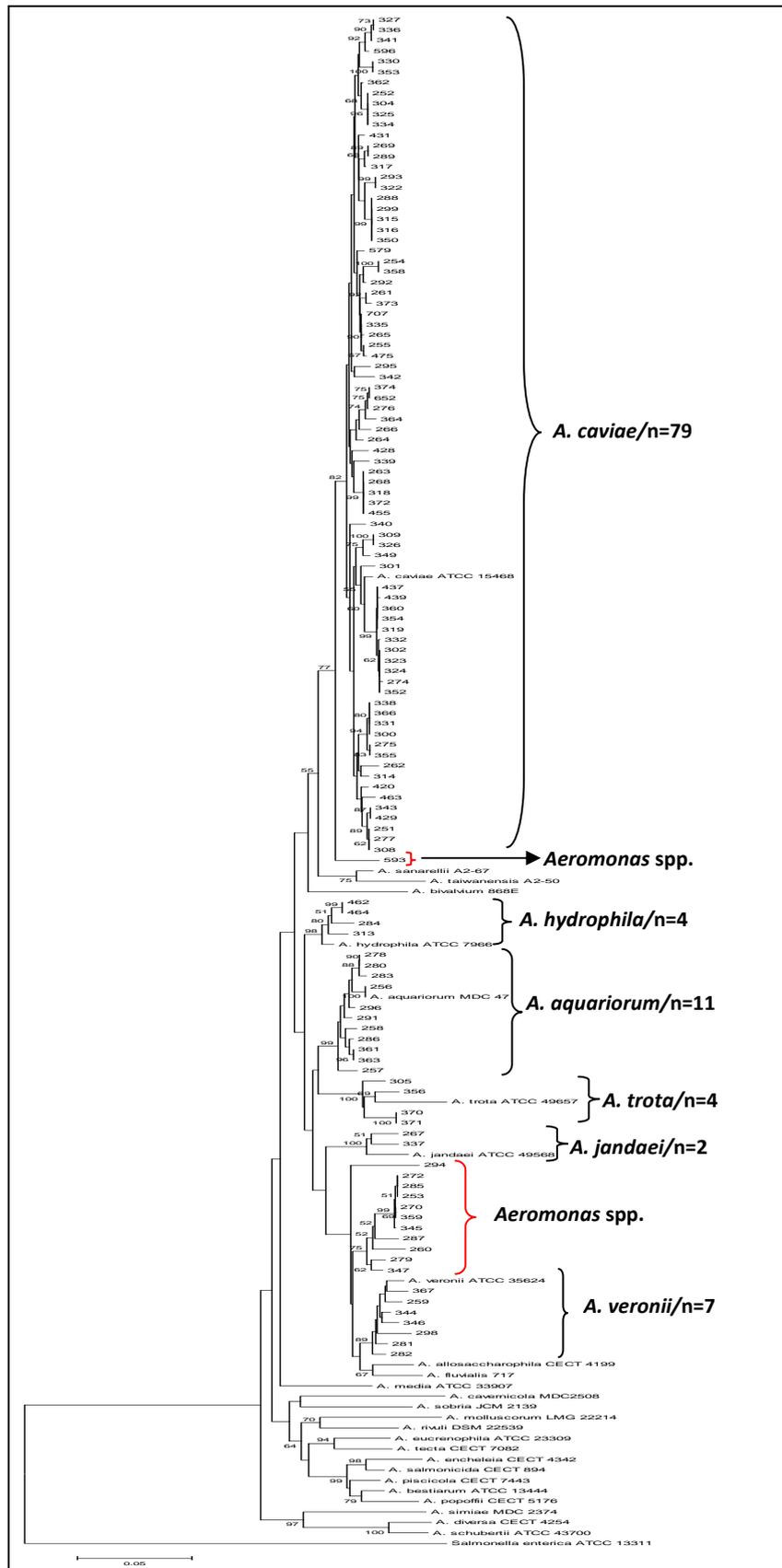


Figura 8: Árvore filogenética (*neighbor-joining*) derivada de seqüências do gene *gyrB* (920 pb). Relação entre 119 isolados de *Aeromonas* e 26 cepas de referência de espécies do gênero, além de um grupo externo representado pelo gênero *Salmonella*. Números próximos aos nós indicam os valores de *bootstrap* ≥ 50 (porcentagem de 1000 replicatas). Destaque em vermelho indica os isolados que não agruparam com nenhuma das espécies.

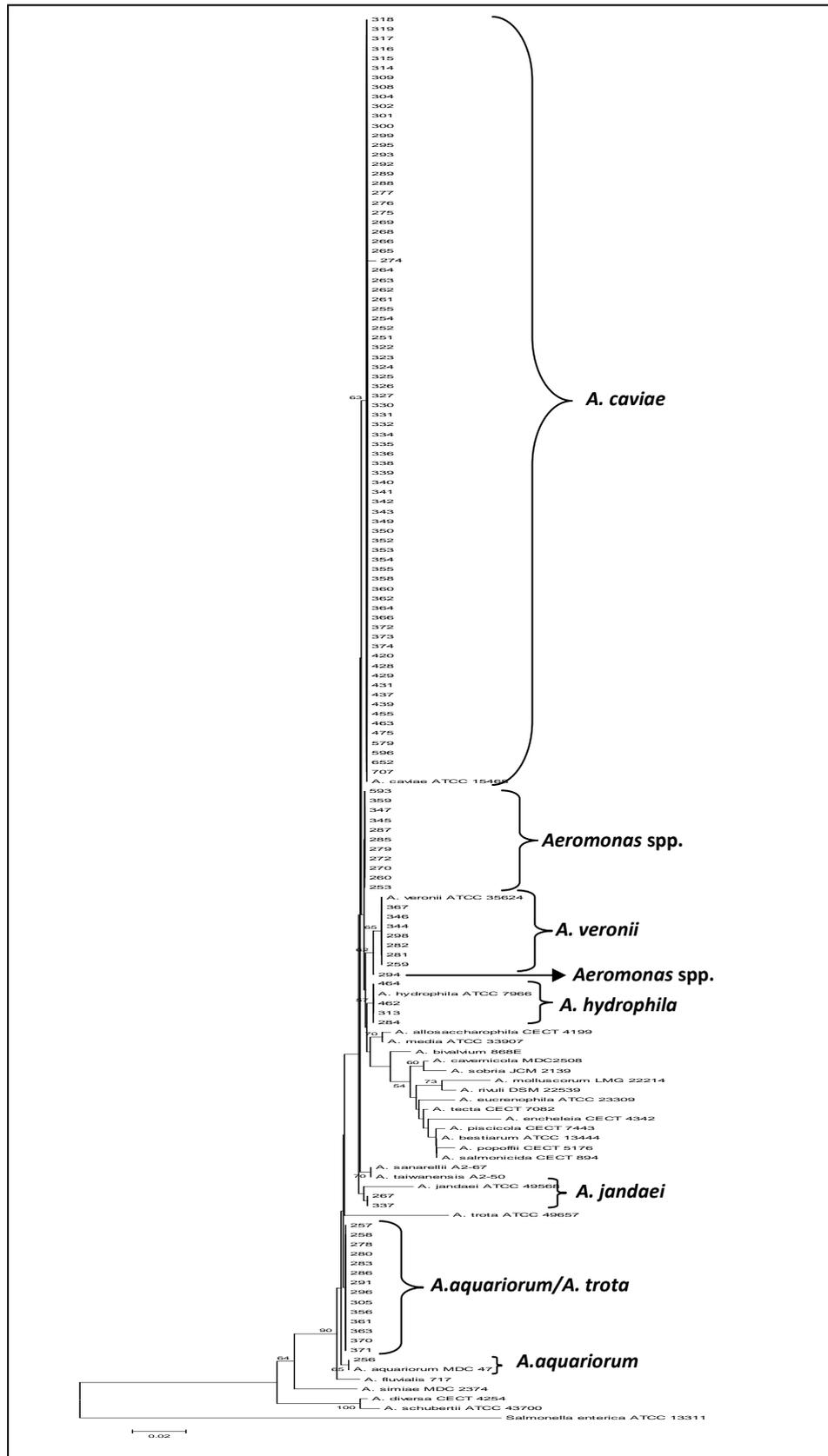


Figura 9: Árvore filogenética (*neighbor-joining*) derivada de seqüências de aminoácidos da proteína GyrB (306 aa). Relação entre 119 isolados de *Aeromonas* e 26 cepas de referência de espécies do gênero, além de um grupo externo representado pelo gênero *Salmonella*. Números próximos aos nós indicam os valores de *bootstrap* ≥ 50 (porcentagem de 1000 replicatas).

5.3 Análise filogenética baseada nas sequências concatenadas dos genes 16S rRNA e *gyrB*

A árvore gerada a partir das sequências contínuas (2374 pb) dos genes 16S rRNA e *gyrB* dos 119 isolados de *Aeromonas*, 26 cepas de referência do gênero e a cepa *Salmonella enterica* ATCC 13311^T (grupo externo) pode ser visualizada na Figura 10. Diante do elevado número de sequências utilizadas para construção da árvore (um total de 146), árvores verticais como a da Figura 10, podem prejudicar a análise das posições de alguns isolados, com isso a árvore filogenética circular foi considerada como uma forma viável para essa demonstração e é apresentada para melhor compreensão dos resultados (Figura 11).

A análise filogenética do 16S rRNA-*gyrB* demonstrou que 79 isolados (66,4%) de *Aeromonas* agruparam com a espécie *A. caviae*; 17 (14,2%) com *A. veronii*; 11 (9,2%) com *A. aquariorum*; 4 (3,4%) com *A. trota*; 4 (3,4%) com *A. hydrophila* e 2 (1,7%) com *A. jandaei*. Todas as espécies se posicionaram em ramos independentes na árvore. Dois isolados, 294 (clínico) e 593 (ambiental), não agruparam com nenhuma das espécies publicadas até o momento. O isolado 593 apresentou relação mais próxima à espécie *A. caviae* e o isolado 294, demonstrou mais proximidade com a espécie *A. veronii*, segundo suas posições na árvore filogenética (figuras 10 e 11).

Dentre os isolados clínicos foram identificadas seis espécies: *A. caviae* (66/103; 64,1%), *A. veronii* (17/103; 16,5%), *A. aquariorum* (11/103; 10,7%), *A. trota* (4/103; 3,9%), *A. hydrophila* (2/103; 1,9%) e *A. jandaei* (2/103; 1,9%). Enquanto que entre os isolados ambientais só foram identificadas as espécies *A.*

caviae (13/16; 81,3) e *A. hydrophila* (2/16; 12,5%). Foi possível observar na árvore a estreita relação entre alguns isolados clínicos e ambientais de *A. caviae*: 319, 354, 360, 437 e 439; 374 e 652; 255 e 475; 265 e 707, respectivamente (Figura 11).

Na análise da relação evolutiva entre as espécies segundo suas posições na árvore filogenética foi verificado que *A. caviae*, *A. sanarellii* e *A. taiwanensis*, são relacionadas evolutivamente e diretamente ligadas a elas aparecem duas espécies também muito relacionadas entre si, *A. trota* e *A. aquariorum*. Também foi identificado um grande complexo composto pelas espécies *A. media*, *A. bivalvium*, *A. molluscorum*, *A. rivuli*, *A. eucrenophila*, *A. tecta*, *A. popoffi*, *A. bestiarum*, *A. piscicola*, *A. encheleia* e *A. salmonicida*. Outro grupo de espécies relacionadas na árvore é composto por *A. jandaei*, *A. allosaccharophila*, *A. fluvialis* e *A. sobria* e *A. veronii*. Por fim verificou-se a estreita relação entre as espécies *A. simiae*, *A. diversa* e *A. schubertii*. É possível verificar também que a maioria dos nós da árvore filogenética apresentaram valores de *bootstrap* maiores que 50.

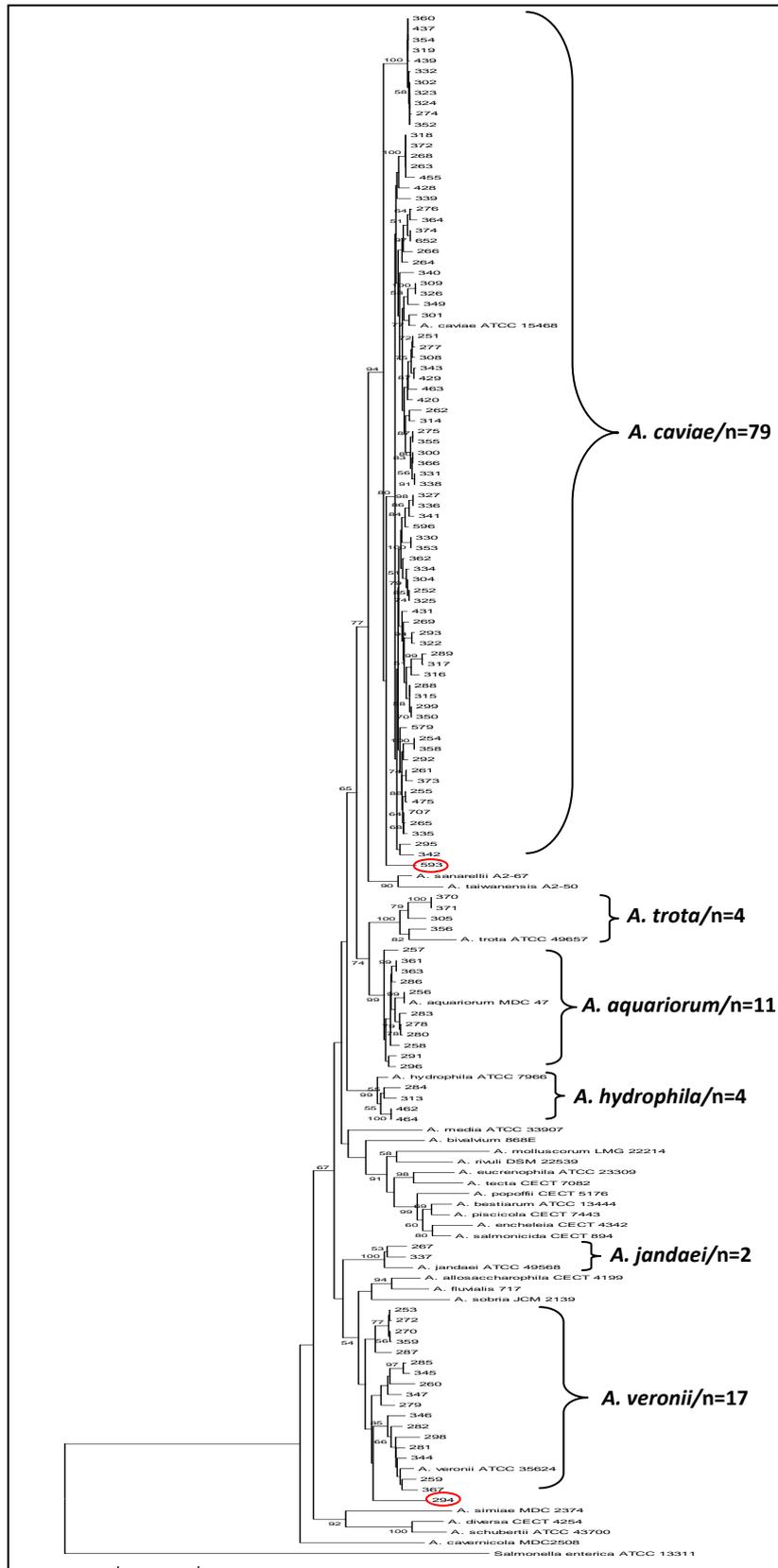


Figura 10: Árvore filogenética (*neighbor-joining*) derivada de seqüências concatenadas dos genes 16S rRNA e *gyrB* (2374 pb). Relação entre 119 isolados de *Aeromonas* e 26 conhecidas espécies do gênero, além de um grupo externo representado pelo gênero *Salmonella*. Números próximos aos nós indicam os valores de *bootstrap* ≥ 50 (porcentagem de 1000 replicatas). Círculos vermelhos indicam os dois isolados (593 e 294) que não agruparam com nenhuma das espécies.

5.4 Comparação dos métodos: filogenia dos genes 16S rRNA-*gyrB*, RFLP do 16S rRNA e testes fenotípicos, para a identificação de espécies de *Aeromonas*.

Os resultados das identificações das espécies obtidos pela análise filogenética das sequências concatenadas dos genes 16S rRNA e *gyrB* foram comparados aos resultados obtidos pelos testes fenotípicos e pelo RFLP do 16S rRNA, realizados anteriormente por Hofer *et al.* (2006) e Mendes-Marques *et al.* (2012) (Tabela 4). Dois isolados (294 e 593) não foram identificados entre as espécies conhecidas do gênero *Aeromonas* pela análise filogenética do 16SrRNA-*gyrB*. Dos 117 isolados identificados entre as espécies de *Aeromonas* pela análise das sequências do 16SrRNA-*gyrB*, 90 (90/117; 77%) apresentaram os mesmos resultados por um e/ou por outro método (RFLP e/ou testes fenotípicos).

Um total de 77 isolados (77/119; 64,7%) foram identificados em nível de espécie pelos três tipos de análises: fenotípica, RFLP do 16S rRNA e filogenia do 16SrRNA-*gyrB*. Entre estes, 54 (54/77; 70,1%) apresentaram as mesmas identificações pelas três análises. Os outros 23 isolados (23/77; 29,9%) apresentaram identificações divergentes (Tabela 5). Sendo a análise filogenética, principalmente de genes *housekeeping*, considerada como padrão ouro para a identificação das espécies do gênero *Aeromonas* (Figueras *et al.*, 2011b), os resultados da análise dos genes 16S rRNA e *gyrB* foram aceitos como os mais confiáveis e utilizados nas análises posteriores desse estudo.

Dez isolados (10/119; 8,4%) não foram caracterizados em nível de espécie pelos testes fenotípicos. Dos 109 isolados identificados por este método, 80

(80/109; 73,4%) apresentaram os mesmos resultados da identificação obtida pela análise filogenética dos genes 16SrRNA-*gyrB*. Os demais isolados (29/109; 26,6%) apresentaram identificações diferentes (Tabela 5).

Um total de 42 isolados (42/119; 35,3%) não foi tipado pelo RFLP do 16S rRNA. Entre os 77 isolados (77/119; 64,7%) identificados por essa técnica, 64 deles (64/77; 83,1%) apresentaram as mesmas identificações obtidas na análise filogenética dos genes 16SrRNA-*gyrB*. Treze isolados (13/77; 16,9%) apresentaram identificações diferentes (Tabela 5).

Entre os 79 isolados identificados pela análise filogenética dos genes 16SrRNA-*gyrB* como a espécie *A. caviae*, 64 deles (64/79; 81%) apresentaram a mesma identificação por pelo menos uma das outras duas formas de análise (fenotípica e/ou RFLP); 69 isolados foram tipados por testes fenotípicos e destes, 13 foram identificados como outras espécies: *A. veronii* (6) e como *A. media* (7); 44 isolados apresentaram mesma identificação pelo RFLP do 16S rRNA e 35 isolados não foram tipados por essa técnica.

O resultado das identificações para a espécie *A. veronii*, mostrou que entre os 17 isolados identificados pela análise filogenética (16SrRNA-*gyrB*) como pertencendo a essa espécie, 12 deles apresentaram a mesma identificação tanto pelo RFLP do 16S rRNA quanto pelos testes fenotípicos. Quatro destes isolados foram tipados pelo RFLP como *A. media* e um não foi tipado por essa técnica. É importante destacar que entre os 36 isolados que foram identificados por testes fenotípicos como *A. veronii*, 18 deles foram identificados como outras espécies (*A. caviae*, *A. trota* e *A. aquariorum*) pela análise filogenética do 16SrRNA-*gyrB*.

A espécie *A. aquariorum*, com 11 isolados identificados após a análise filogenética dos genes 16S rRNA-*gyrB*, foi classificada como *A. caviae* e *A. veronii* pelo RFLP do 16S rRNA e pelos testes fenotípicos, respectivamente.

Das outras três espécies que ocorreram em menor frequência pela análise filogenética dos genes 16S rRNA-*gyrB*, *A. hydrophila* se destacou porque os seus quatro isolados tiveram a mesma identificação pelos testes fenotípicos e pelo RFLP do 16S rRNA. Dos quatro isolados identificados como *A. trota*, três foram da mesma forma identificados pelo RFLP e um não foi tipado por essa técnica; e três isolados foram diferentemente identificados pelos testes fenotípicos como *A. veronii*, *A. jandaei* e *A. schubertii*. Por último, a espécie *A. jandaei*, com apenas dois isolados identificados pela análise filogenética, um deles da mesma forma identificado pelo RFLP e pelos testes fenotípicos e o outro não tipado pelo RFLP, mas com mesma identificação fenotípica.

Tabela 4: Resultados da identificação em nível de espécie de 119 isolados de *Aeromonas*, baseados em três métodos: filogenia dos genes 16S rRNA-*gyrB*, RFLP do 16S rRNA e testes fenotípicos.

16SrRNA-<i>gyrB</i>	16SrRNA-RFLP	Testes fenotípicos
79 <i>A. caviae</i>	53 <i>A. caviae</i>	57 <i>A. caviae</i>
17 <i>A. veronii</i>	12 <i>A. veronii</i>	36 <i>A. veronii</i>
11 <i>A. aquariorum</i>	_____	_____
4 <i>A. trota</i>	3 <i>A. trota</i>	1 <i>A. trota</i>
4 <i>A. hydrophila</i>	4 <i>A. hydrophila</i>	4 <i>A. hydrophila</i>
2 <i>A. jandaei</i>	1 <i>A. jandaei</i>	3 <i>A. jandaei</i>
_____	4 <i>A. media</i>	7 <i>A. media</i>
_____	_____	1 <i>A. schubertii</i>
2 <i>Aeromonas spp.</i>	_____	_____
_____	42 Não tipadas	10 Não tipadas

Tabela 5: Comparação dos resultados da identificação em nível de espécie de 119 isolados de *Aeromonas* por três métodos de análise: testes fenotípicos, RFLP do 16S rRNA e filogenia dos genes 16S rRNA-*gyrB*.

Testes fenotípicos	16SrRNA-RFLP	16SrRNA- <i>gyrB</i>	Isolados
<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	251, 252, 254, 255, 261, 262, 263, 265, 266, 268, 269, 274, 275, 276, 277, 288, 292, 293, 295, 299, 301, 302, 308, 309, 314, 315, 317, 319, 322, 324, 325, 327, 331, 463, 579 e 596
<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>	259, 260, 279, 281, 282, 285, 298, 344, 345, 346, 347 e 367
<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	284, 313, 462 e 464
<i>A. trota</i>	<i>A. trota</i>	<i>A. trota</i>	371
<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>	337
<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	264, 289, 300, 304 e 316
<i>A. veronii</i>	<i>A. trota</i>	<i>A. trota</i>	305
<i>A. veronii</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	335, 339 e 340
<i>A. jandaei</i>	<i>A. trota</i>	<i>A. trota</i>	356
<i>A. veronii</i>	<i>A. media</i>	<i>A. veronii</i>	253, 270, 272 e 287
<i>A. jandaei</i>	Não tipada	<i>A. jandaei</i>	267
<i>A. caviae</i>	Não tipadas	<i>A. caviae</i>	318, 330, 332, 334, 336, 341, 342, 343, 349, 350, 352, 353, 354, 358, 360, 362, 364, 372, 373 e 374
<i>A. veronii</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>	256, 257, 258, 278, 283, 286, 291, 296 e 363
<i>A. veronii</i>	Não tipada	<i>A. veronii</i>	359
<i>A. veronii</i>	Não tipadas	<i>A. aquariorum</i>	280 e 361
<i>A. veronii</i>	Não tipadas	<i>A. caviae</i>	323, 326 e 355
<i>A. schubertii</i>	Não tipada	<i>A. trota</i>	370
<i>A. media</i>	Não tipadas	<i>A. caviae</i>	338, 366
Não tipadas	Não tipadas	<i>A. caviae</i>	420, 428, 429, 431, 437, 439, 455, 475, 652 e 707
<i>A. veronii</i>	Não tipada	<i>Aeromonas</i> spp.	294
<i>A. caviae</i>	Não tipada	<i>Aeromonas</i> spp.	593

5.5 Rede filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA

Após separar as colunas contendo sítios polimórficos do alinhamento das sequências do gene 16S rRNA, foram obtidos 79 pb por sequência. Conseqüentemente a rede filogenética foi definida como grupo de diferentes genótipos, cada um compartilhando 78 pb idênticos com pelo menos outro membro da rede.

A rede filogenética gerada a partir das sequências do gene 16S rRNA dos isolados e cepas de referência de *Aeromonas* é representada por um diagrama radial em que o genótipo fundador da população, posicionado centralmente (círculo azul), apresenta ligações radiais com todos os seus genótipos descendentes (círculos amarelos e pretos) e cada círculo numerado representa um diferente genótipo (Figura 12). A rede filogenética gerada comportou 84 dos 119 isolados do surto, enquanto que 35 isolados não apresentaram relação com o grupo fundador e foram desvinculados da rede, estes são tidos como genótipos satélites. A Tabela 6 mostra os genótipos, inclusive aqueles satélites, identificados pelo algoritmo eBURST e os isolados de *Aeromonas* que representam cada um desses genótipos.

De acordo com o diagrama gerado, um grupo de 44 isolados (44/119; 37%) de *A. caviae* (35 clínicos e 9 ambientais) apresentou o genótipo atribuído como fundador da população, G51 (círculo azul). A cepa *A. caviae* ATCC 15468^T também representa esse genótipo. Nessa análise, o genótipo fundador também foi o que apresentou maior prevalência de isolados e o valor de *bootstrap* para esse agrupamento foi de 96%.

O G51 (fundador primário) está diretamente ligado a outros oito genótipos variantes (G6, G31, G41, G50, G24, G5, G55 e G7), cada um com apenas uma substituição nucleotídica em relação ao genótipo fundador. Com exceção do G50, representado por isolados da espécie *A. aquariorum*, todos esses genótipos são exclusivos da espécie *A. caviae*. É importante destacar que a área dos círculos é proporcional à prevalência de isolados representando cada um desses genótipos.

Todos os genótipos com pelo menos dois descendentes são tidos como fundadores de subgrupos e são representados no diagrama por círculos amarelos (G7, G39 e G50). Um isolado ambiental (475) e outro clínico (255) representam o G7, do qual descendem o G35 e o G39, ambos representados por isolados de *A. caviae*. O G7 e todos os genótipos que dele descendem apresentam uma transição C/T na posição 1011 da sequência do gene 16S rRNA. O G39 é o fundador de subgrupo com maior prevalência de isolados (15/119; 12,6%) e além do polimorfismo apresentado pelo G7, ele traz uma transição (G/A) na posição 1018 do 16S rRNA que é apresentada por todos os genótipos que dele descendem.

Três genótipos descendem do G39, um deles, o G22, é representado por um isolado de *A. caviae* (340) e apresenta uma transversão (T/A) na posição 366 do 16S rRNA que o diferencia do G39. Os outros dois genótipos que descendem do G39 apresentam polimorfismos que dão origem a duas outras espécies de *Aeromonas*, estreitamente relacionadas à *A. caviae*. O G53, representado por cinco isolados de *A. aquariorum* (256, 258, 283, 361 e 363) e pela cepa de referência *A. aquariorum* MDC 47, apresenta uma transição (A/G), na posição 476 da sequência, que diferencia essa espécie de todos os isolados de *A. caviae* e *A. trota*. O G42, também descendente do G39, é representado por um isolado de *A.*

trota (356) e pela cepa de referência *A. trota* ATCC 49657, esse genótipo apresenta uma transição G/A na posição 649, que diferencia essa espécie de todos os isolados de *A. caviae* e *A. aquariorum*. Essa substituição nucleotídica também está presente nos três isolados de *A. trota* desvinculados da rede (305, 370 e 371).

Como é observado, cada genótipo que se liga para fora do diagrama, acumula mais um polimorfismo em relação ao genótipo fundador, por exemplo: na sequência “G51-G7-G39-G22”, temos que G7 apresenta um polimorfismo, G39 apresenta dois polimorfismos e G22 apresenta três polimorfismos, em relação ao G51. Assim cada genótipo apresenta um tipo exclusivo de sequência para o gene 16S rRNA, seja pelo número ou seja pelo tipo de polimorfismo que apresente.

O G50 (isolados 257, 286 e 296), ligado diretamente ao genótipo fundador (G51) e todos os demais genótipos que dele descendem são exclusivos da espécie *A. aquariorum* e apresentam o mesmo polimorfismo, na posição 476, que diferencia essa espécie de *A. caviae* e *A. trota*, presente também no G53, que corresponde a outro genótipo representante dessa espécie, que está ligado ao G39. A partir do G50 descendem diretamente o G43 e o G10. O G43, representado pelo isolado 291, além do polimorfismo da posição 476, apresenta uma transversão G/C na posição 805, já o G10 (isolado 278) apresenta polimorfismo na posição 1018, entretanto ao contrário da transição G/A observada no G39 e seus descendentes, nessa mesma posição, o G10 apresenta uma transversão T/A. O G20 (isolado 280), que descende do G10, apresenta um polimorfismo na posição 1011, que ao invés da transição C/T observada no G7 e seus descendentes, nessa mesma posição, é uma transversão A/T.

Os isolados clínicos e ambientais de *A. caviae*, que apresentaram estreita relação na árvore filogenética baseada nas sequências concatenadas do 16S rRNA e *gyrB*, representaram o mesmo genótipo na rede filogenética: 255 e 475 (G7); 374 e 652 (G51); 265 e 707 (G51); 319, 354, 360, 437 e 439 (G51).

Isolados pertencentes às espécies *A. veronii*, *A. jandaei* e *A. hydrophila*, identificadas nesse estudo, além de sete isolados de *A. caviae* e três de *A. trota*, foram desvinculados dessa rede filogenética (Tabela 6), devido a um grande número de variações nucleotídicas em relação ao genótipo fundador da população. Os isolados clínicos (284 e 313) e ambientais (462 e 464) de *A. hydrophila* representaram genótipos distintos, G9 e G45, respectivamente. Entre os 17 isolados de *A. veronii* foram observados nove genótipos e os dois isolados de *A. jandaei* apresentaram genótipos diferentes. Os isolados 294 e 593, que pela filogenia do 16S rRNA-*gyrB* não foram classificados entre as espécies conhecidas de *Aeromonas*, também representaram genótipos satélites (G26 e G57, respectivamente).

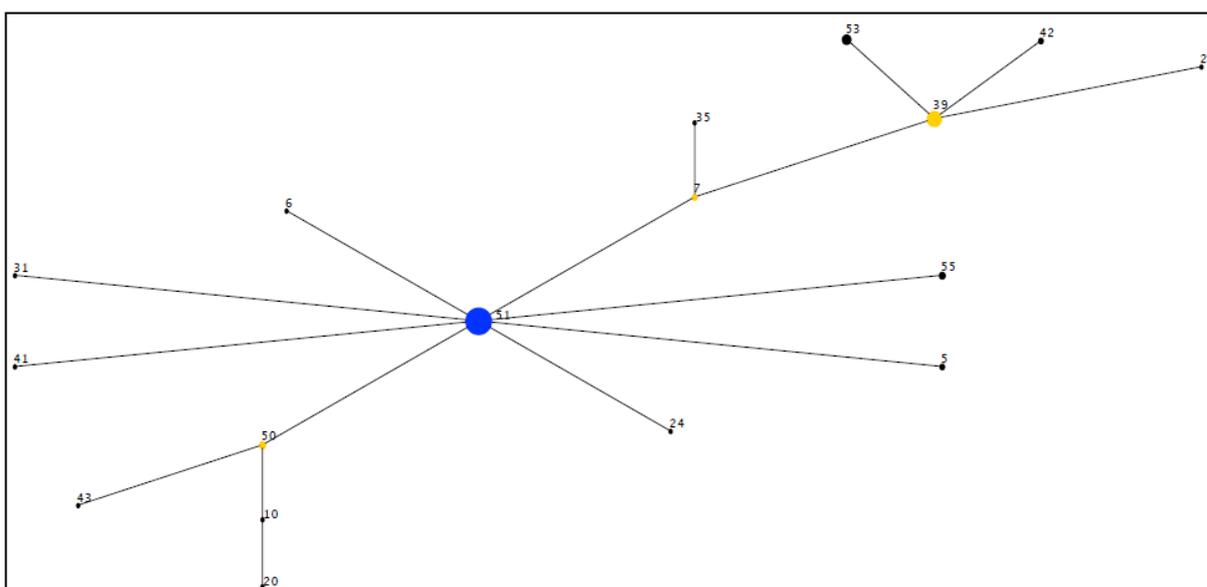


Figura 12: Diagrama eBURST baseado nas sequências do gene 16S rRNA de isolados e cepas de referência de *Aeromonas*. Círculo azul representa o genótipo fundador da população, círculos amarelos representam genótipos fundadores de subgrupos, círculos pretos representam os demais genótipos descendentes.

Tabela 6: Distribuição de 119 isolados e 26 cepas de referência de *Aeromonas* entre os 59 diferentes genótipos identificados pelo algoritmo eBURST a partir do gene 16S rRNA.

Genótipo	Isolados e cepas de referência
*1	260, 282, <i>A. veronii</i> ATCC 35624
*2	<i>A. schubertii</i> ATCC 43700
*3	279
*4	<i>A. salmonicida</i> CECT 894
5	299, 350
6	277
7	255, 475
*8	<i>A. sobria</i> JCM 2139
*9	284, 313, <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966
10	278
*11	<i>A. bestiarum</i> ATCC 13444, <i>A. piscicola</i> CECT 7443
*12	253
*13	<i>A. rivuli</i> DSM 22539
*14	335
*15	<i>A. fluvialis</i> 717
*16	<i>A. simiae</i> MDC 2374
*17	<i>A. bivalvium</i> 868E
*18	349
*19	305
20	280
* 21	289
22	340
*23	316
24	431
*25	370, 371
*26	294
*27	267, <i>A. jandaei</i> ATCC 49568
*28	455
*29	<i>A. eucrenophila</i> ATCC 23309
*30	270, 272, 287
31	579
*32	346
*33	317
*34	341
35	373
*36	359
*37	<i>A. allosaccharophila</i> CECT 4199
*38	<i>A. molluscorum</i> LMG 22214
39	262, 264, 266, 276, 292, 293, 308, 314, 327, 331, 334, 336, 338, 339, 364
*40	285
41	322
42	356, <i>A. trota</i> ATCC 49657
43	291
*44	<i>A. media</i> ATCC 33907
*45	462, 464
*46	259, 281, 298, 344, 345, 347, 367
*47	337
*48	<i>A. encheleia</i> CECT 4342
*49	<i>A. diversa</i> CECT 4254
50	257, 286, 296
51	251, 254, 261, 263, 265, 268, 269, 274, 275, 288, 295, 300, 301, 302, 304, 309, 315, 318, 319, 323, 324, 326, 330, 332, 342, 352, 353, 354, 355, 358, 360, 362, 366, 372, 374, 420, 428, 429, 437, 439, 463, 596, 652, 707, <i>A. caviae</i> ATCC 15468
*52	<i>A. tecta</i> CECT 7082
53	256, 258, 283, 361, 363, <i>A. aquariorum</i> MDC 47
*54	<i>A. popoffii</i> CECT 5176
55	252, 325, 343
*56	<i>A. sanarellii</i> A2-67
*57	593
*58	<i>A. taiwanensis</i> A2-50
*59	<i>A. cavernicola</i> MDC 2508

*Genótipos satélites

5.6 Detecção de genes de virulência

Quando alinhadas às sequências de cepas de referência depositadas no banco de dados do NCBI, através do programa BLASTn, as sequências dos três genes (*alt*, *ast* e *hlyA*) amplificados de três isolados do surto e na cepa de referência *A. hydrophila* ATCC 7966^T, apresentaram de 98 a 100% de identidade com sequências dos genes correspondentes.

O gene *alt*, apresentou uma elevada frequência entre os isolados 81,5% (97/119), e foi detectado em cinco das seis espécies identificadas neste estudo: *A. hydrophila* (4/4; 100%), *A. aquariorum* (10/11; 91%); *A. caviae* (71/79; 90%); *A. veronii* (9/17; 53%) e *A. trota* (2/4; 50%). Os genes *ast* e *hlyA* tiveram uma frequência menor entre os isolados, 13,4% (16/119) e 11,8% (14/119), respectivamente e foram detectados entre isolados das espécies *A. hydrophila*, *A. aquariorum* e *A. caviae*. O gene *ast* foi detectado em três isolados de *A. hydrophila* (3/4; 75%), em dois de *A. aquariorum* (2/11; 18,2%) e 11 de *A. caviae* (11/79; 13,9%). O gene *hlyA* foi detectado nos quatro isolados de *A. hydrophila* (4/4; 100%), em nove de *A. aquariorum* (9/11; 81,8%) e em um isolado de *A. caviae* (1/79; 1,3%). Os genes *alt*, *ast* e *hlyA* tiveram uma frequência maior entre isolados ambientais do que entre isolados clínicos, com uma diferença de 21,4%, 27,8% e 8% a mais para isolados ambientais, respectivamente.

A análise das combinações baseadas nos sete genes (*aerA*, *exu*, *lip*, *flaA/B*, *alt*, *ast* e *hlyA*) revelou 29 diferentes “perfis de virulência” (Tabela 7). A combinação dos genes “*exu*, *lip*, *flaA/B* e *alt*” foi a mais comum entre os isolados (28/119; 23,5%), seguida por “*aerA*, *exu*, *lip*, *flaA/B* e *alt*” (21/119; 17,6%) e “*aerA*, *exu*, *lip* e *flaA/B*” (10/119; 8,4%). Todos os isolados apresentaram pelo menos um

dos genes de virulência, sendo que em 90 deles (90/119; 75,6%) foram detectados quatro ou mais desses genes. Três isolados (3/119; 2,5%) amplificaram os sete genes de virulência. As combinações de genes de virulência encontradas nesse estudo e seus isolados representantes podem ser visualizadas no Anexo C.

A espécie *A. caviae*, apresentou 18 diferentes combinações, variando de dois a sete genes, e apenas dois isolados (2/79; 2,5%) portando um único gene. Treze dessas combinações de genes foram exclusivas dessa espécie. A maioria dos isolados (37/79; 46,8%) foi positiva para quatro genes de virulência, sendo a combinação “*exu*, *lip*, *flaA/B* e *alt*” a mais comum e exclusiva dessa espécie, ocorrendo em 28 isolados (28/79; 35,4%), seguida por “*aerA*, *exu*, *lip*, *flaA/B* e *alt*” (13/79; 16,5%). Um isolado de *A. caviae* amplificou os sete genes de virulência.

A espécie *A. veronii*, apresentou quatro diferentes combinações, variando de três a cinco genes, entre seus 17 isolados, mas nenhuma delas foi exclusiva para essa espécie. A maioria dos isolados (9/17; 52,9%) foi positiva para quatro genes de virulência, sendo a combinação dos genes “*aerA*, *exu*, *lip* e *fla A/B*” que ocorreu em oito desses isolados (8/17; 47%), a mais comum e também quase que exclusiva da espécie *A. veronii*, uma vez que apenas dois outros isolados apresentaram esse mesmo perfil de genes. A combinação dos genes “*aerA*, *exu*, *lip*, *flaA/B* e *alt*” foi a segunda mais frequente para essa espécie (6/17; 35,3%).

Entre os isolados da espécie *A. aquariorum* foram observadas seis diferentes combinações de genes, variando de quatro a seis genes, quatro delas exclusivas dessa espécie. A maioria dos isolados apresentaram seis genes (5/11; 45,4%), sendo a combinação dos genes “*aerA*, *exu*, *lip*, *flaA/B*, *alt* e *hlyA*” a mais comum, e além disso, exclusiva dessa espécie.

Três combinações de genes de virulência foram observadas entre os quatro isolados da espécie *A. hydrophila*, variando de cinco a sete genes e apenas uma dessas combinações foi exclusiva dessa espécie. Dois dos isolados da espécie (2/4; 50%) apresentaram todos os sete genes analisados. A espécie *A. trota* apresentou três combinações de três ou quatro genes entre seus quatro isolados e apenas uma dessas combinações foi exclusiva dessa espécie. Três isolados apresentaram três genes e um apresentou quatro genes. Os dois isolados identificados como *A. jandaei* apresentaram diferentes combinações de três e de quatro genes de virulência, sendo que nenhuma foi exclusiva dessa espécie.

A presença de ambos os genes *aerA* e *hlyA*, ocorreu em dez isolados de *Aeromonas*, sendo seis isolados de *A. aquariorum*, três de *A. hydrophila* e um de *A. caviae*. Já a presença simultânea dos genes *alt* e *ast*, foi verificada em 12 isolados, sendo oito de *A. caviae*, três de *A. hydrophila* e um de *A. aquariorum*.

Analisando a frequência dos sete genes de virulência entre os isolados clínicos, e ambientais foi observado que a maioria dos isolados clínicos apresentou quatro ou mais desses genes (74/103; 71,8%). Um isolado clínico apresentou os sete genes analisados. Entre os isolados ambientais foi verificado que 100% deles apresentaram quatro ou mais genes de virulência e dois isolados apresentaram os sete genes.

Tabela 7: Distribuição de genes de virulência entre as espécies clínicas e ambientais de *Aeromonas* confirmadas em surto de diarreia ocorrido no município de São Bento do Una – PE.

Espécies	Total de isolados	*aerA	*exu	*lip	*fla A/B	alt	ast	hlyA	Nº de isolados
Isolados clínicos									
<i>A. caviae</i>	66	-	-	-	-	+	-	-	1
		-	-	+	-	-	-	-	1
		-	+	-	-	+	-	-	2
		-	-	+	-	+	-	-	2
		-	+	-	+	-	-	-	1
		-	-	+	+	+	-	-	3
		-	+	+	-	+	-	-	7
		-	+	+	+	+	-	-	3
		-	+	-	+	+	-	-	3
		-	+	+	+	+	-	-	21
		-	+	+	+	+	-	+	3
		+	-	+	+	+	-	-	1
		+	+	+	-	+	-	-	3
		+	+	+	+	+	-	-	11
		+	+	+	-	+	+	-	1
		+	+	+	+	+	+	+	1
+	+	+	+	+	+	+	1		
<i>A. hydrophila</i>	2	+	+	-	+	+	-	+	1
		+	+	+	+	+	+	+	1
<i>A. aquariorum</i>	11	-	+	-	+	+	-	+	1
		-	+	-	+	-	+	+	1
		+	-	+	+	+	-	+	2
		+	+	+	+	+	-	-	2
		+	+	+	+	+	-	+	4
-	+	+	+	+	+	+	1		
<i>A. trota</i>	4	-	+	-	+	+	-	-	1
		+	+	-	+	-	-	-	2
		+	+	-	+	+	-	-	1
<i>A. jandaei</i>	2	+	+	-	+	-	-	-	1
		+	+	+	+	-	-	-	1
<i>A. veronii</i>	17	-	-	+	+	+	-	-	2
		+	+	+	+	-	-	-	8
		+	+	+	-	+	-	-	1
		+	+	+	+	+	-	-	6
<i>Aeromonas spp.</i>	1	+	+	+	+	-	-	-	1
Isolados ambientais									
<i>A. caviae</i>	13	-	+	+	+	+	-	-	7
		-	+	+	-	+	+	-	1
		+	+	+	+	+	-	-	2
		-	+	+	+	+	+	-	2
		+	+	+	+	+	+	+	1
<i>A. hydrophila</i>	2	-	+	+	+	+	+	+	1
		+	+	+	+	+	+	+	1
<i>Aeromonas spp.</i>	1	+	+	+	-	+	-	-	1

*Genes pesquisados por Mendes-Marques *et al.* (2012)

5.7 Distribuição e características dos isolados de *Aeromonas* nas áreas urbanas e rurais do município de São Bento do Una, Pernambuco

A Figura 13 mostra o mapa com a distribuição geral de 48 isolados/pacientes no município de São Bento do Una, Pernambuco. Os isolados utilizados nesta análise abrangem todas as seis espécies de *Aeromonas* identificadas pela análise filogenética do 16S rRNA-*gyrB*.

De acordo com o mapa, muitos pontos representando os isolados de *Aeromonas*, se posicionaram dentro do perímetro urbano do município, e alguns deles não foram evidenciados devido à sobreposição de alguns desses pontos. Tal fato não foi verificado entre os isolados obtidos de pacientes de áreas rurais. Devido a sobreposição de pontos, foi gerado outro mapa contendo apenas os isolados obtidos de pacientes que residiam em áreas urbanas e esses foram aleatoriamente divididos em três grupos, cada grupo representado por uma cor diferente. A resolução do mapa foi aumentada e os grupos foram apresentados separadamente, com o propósito de melhor visualizar as localizações de cada isolado (Figura 14). Nas áreas urbanas do município, claramente se observa uma maior aglomeração dos isolados (30/48; 62,5%) do que nas áreas rurais (18/48; 37,5%).

A observação dos mapas demonstrou que 60% dos isolados obtidos de pacientes que residiam em áreas urbanas pertenceram à espécie *A. caviae*; 13,4% a *A. aquariorum*; 10% a *A. trota*; 10% a *A. veronii*; 3,3% a *A. hydrophila* e 3,3% a *Aeromonas* spp. Já entre os isolados obtidos de pacientes que residiam em áreas rurais foram identificados 44,4% como pertencendo à espécie *A. caviae*; 33,3% à *A. veronii*; 16,7% à *A. aquariorum* e 5,6% à *A. jandaei*.

Foi possível verificar também que tanto entre os isolados de *A. caviae* das áreas rurais como os das áreas urbanas, houve uma maior prevalência de representantes do genótipo fundador (G51), visto no tópico 5.5, sendo as porcentagens bem parecidas, 50% (4/8) e 55,5% (10/18), respectivamente. Os outros isolados de *A. caviae* de áreas rurais (50%) apresentaram o G39 (fundador de subgrupo). Entre os demais isolados de *A. caviae* obtidos de pacientes de áreas urbanas, três (16,7%) apresentaram o G39, quatro (22,2%) apresentaram outros genótipos que estavam dispostos na rede filogenética (G5, G6, G35 e G55), ligados diretamente ao genótipo fundador e apenas um (5,6%) apresentou um genótipo satélite (G21).

Quatro isolados de *A. veronii* de áreas rurais apresentaram genótipos variados (G3, G12, G30 e G40) e dois apresentaram mesmo genótipo (G15). Já nas áreas urbanas, um isolado de *A. veronii* apresentou o G30 e dois isolados apresentaram o G46. Entre os isolados de *A. aquariorum* obtidos de pacientes de áreas rurais, dois apresentaram o G53 e um apresentou o G50, já entre os isolados obtidos de áreas urbanas, dois apresentaram o G50, um apresentou o G53 e outro apresentou o G20. Com os isolados das outras espécies (*A. hydrophila*, *A. trota* e *A. jandaei*), não se pôde fazer essa comparação, porque nenhuma delas ocorreu nas duas áreas, dentro da amostragem utilizada nessa análise.

Em relação aos perfis de virulência, vistos no tópico 5.6, foi observado que entre os isolados de *A. caviae* de áreas urbanas e rurais o perfil de genes de virulência mais frequente foi o mesmo: “*aerA*⁻ *exu*⁺ *lip*⁺ *fla*⁺ *alt*⁺ *ast*⁻ *hlyA*”, com aproximadamente as mesmas frequências, 38,9% e 37,5% entre os isolados, respectivamente e esse perfil de virulência foi específico para essa espécie. O

perfil “*aerA*⁺ *exu*⁺ *lip*⁺ *fla*⁺ *alt*⁺ *ast*⁻ *hlyA*””, segundo mais frequente (22,2%) entre os isolados de *A. caviae* de pacientes de áreas urbanas, não foi identificado entre isolados dessa espécie de áreas rurais. Por sua vez, os isolados de *A. caviae* das áreas rurais apresentaram o perfil “*aerA*⁻ *exu*⁺ *lip*⁻ *fla*⁺ *alt*⁺ *ast*⁻ *hlyA*””, como o segundo mais frequente (25%), e esse perfil não foi verificado entre os isolados de *A. caviae* de áreas urbanas, mas foi verificado em outras espécies nessas áreas. Outros perfis de virulência que ocorreram em menor frequência foram exclusivos de isolados de *A. caviae* de áreas rurais ou urbanas, dentro da amostragem analisada.

Para a espécie *A. veronii* o perfil de virulência mais frequente entre isolados de áreas urbanas foi “*aerA*⁺ *exu*⁺ *lip*⁺ *fla*⁺ *alt*⁺ *ast*⁻ *hlyA*””, detectado em 75% dos isolados, esse mesmo perfil ocorreu em 33,3% dos isolados de *A. veronii* de áreas rurais. O perfil mais detectado nas áreas rurais foi “*aerA*⁺ *exu*⁺ *lip*⁺ *fla*⁺ *alt*⁻ *ast*⁻ *hlyA*””, em 66,7% dos isolados da espécie, esse mesmo perfil foi verificado em 25% dos isolados *A. veronii* de áreas urbanas.

Para a espécie *A. aquariorum*, nas áreas urbanas prevaleceram igualmente os perfis de virulência “*aerA*⁺ *exu*⁺ *lip*⁺ *fla*⁺ *alt*⁺ *ast*⁻ *hlyA*”” e “*aerA*⁺ *exu*⁺ *lip*⁺ *fla*⁺ *alt*⁺ *ast*⁻ *hlyA*””, esse último foi apresentado por um isolado obtido de área rural. Os demais isolados de *A. aquariorum* de áreas rurais apresentaram perfis de virulência que não foram identificados entre os isolados de áreas urbanas “*aerA*⁻ *exu*⁺ *lip*⁻ *fla*⁺ *alt*⁺ *ast*⁻ *hlyA*”” e “*aerA*⁺ *exu*⁻ *lip*⁺ *fla*⁺ *alt*⁺ *ast*⁻ *hlyA*””.

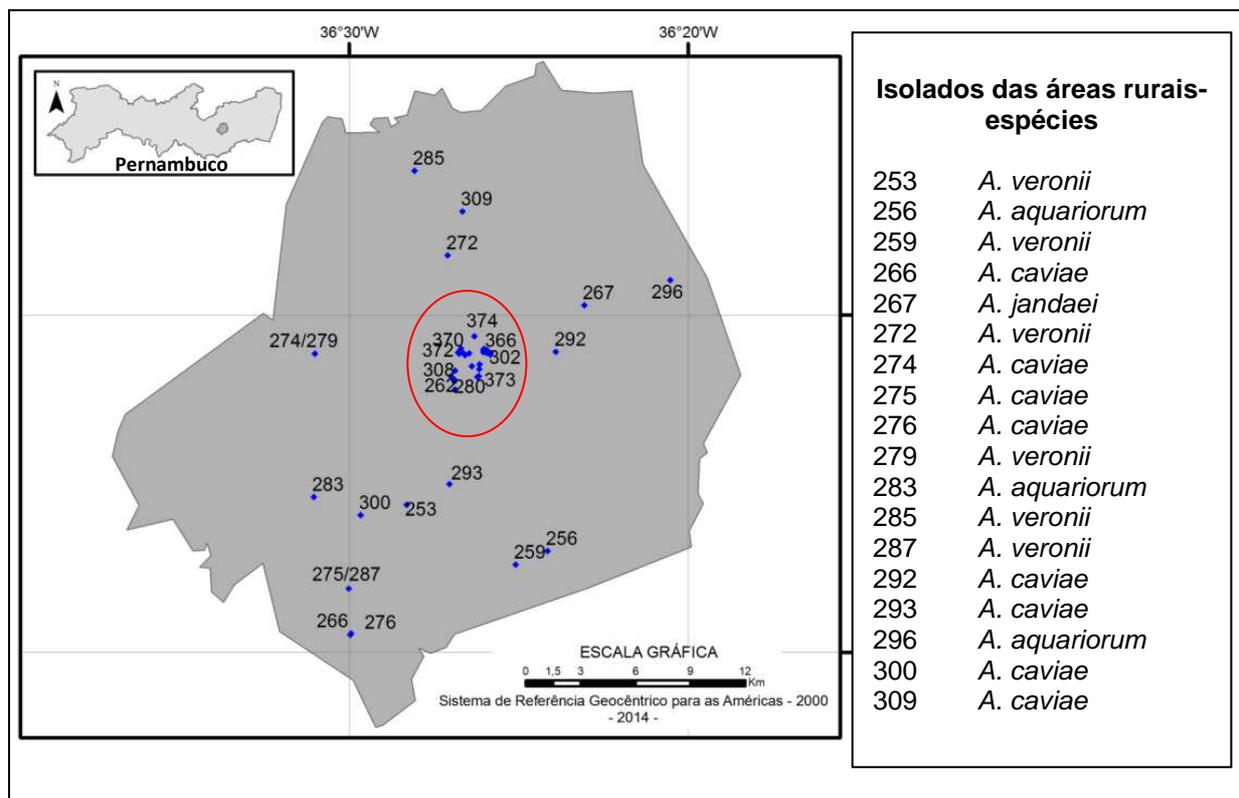


Figura 13: Distribuição geral de 48 isolados de *Aeromonas* no município de São Bento do Una, Pernambuco. Análise baseada no local de residência dos pacientes dos quais foram obtidos os isolados. Círculo vermelho representa aglomeração de isolados no perímetro urbano que levou a sobreposição de pontos. Caixa a direita indica todos isolados que se localizaram nos perímetros rurais e as espécies as quais pertencem.

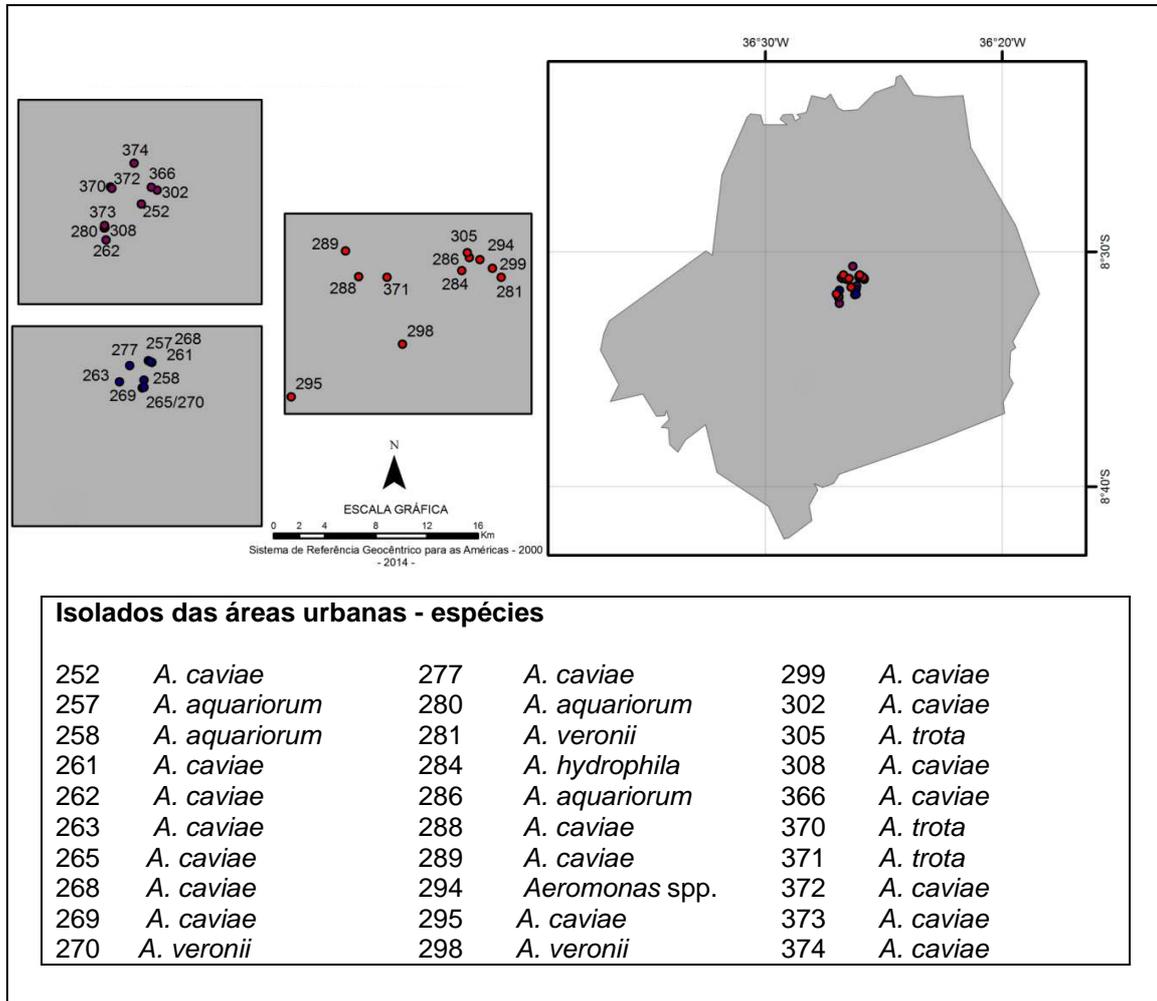


Figura 14: Distribuição dos 30 isolados de *Aeromonas* obtidos de pacientes que residiam em áreas urbanas do município de São Bento do Una, Pernambuco. Isolados foram aleatoriamente divididos em 3 grupos representados por pontos de cores diferentes, apresentados nas caixas a esquerda da figura, com aumento da resolução. Caixa abaixo indica todos isolados que se localizaram nos perímetros urbanos e as espécies as quais pertencem.

6. Discussão

A análise filogenética das sequências do gene 16S rRNA revelou uma maior prevalência da espécie *A. caviae* entre isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas*, obtidos durante um surto de diarreia em São Bento do Una. Por outro lado a análise desse gene não foi suficiente para esclarecer as relações de um grande número de isolados, que não agruparam com nenhuma das espécies conhecidas do gênero. Isso provavelmente ocorreu porque em alguns casos a variabilidade intraespecífica excedeu a variabilidade interespecífica. Com isso, isolados de espécies diferentes apareceram intermisturados na árvore filogenética e baixos valores de *bootstrap* foram visualizados, reduzindo a confiabilidade de alguns ramos da árvore.

A diversidade nucleotídica intra-espécie ocorre em grande parte devido à presença de microheterogeneidades intragenômicas, que estão concentradas em regiões específicas (*hot spots*) do gene 16S rRNA, e já foram verificadas em algumas espécies de *Aeromonas* (Alperi *et al.*, 2008). Nesse estudo foi observado que todas as espécies identificadas apresentaram microheterogeneidades e as mais frequentes ocorreram nas posições 1011 e 1018 da sequência do 16S rRNA. Acreditando que a diferenciação funcional entre operons de genes de rRNA permite a expressão diferencial em resposta às mudanças ambientais e reflete no processo de adaptação a diversos nichos (Gunderson *et al.*, 1987; Case *et al.*, 2007, Roger *et al.*, 2012a), é possível então que as posições 1011 e 1018 desempenhem importante papel nesses aspectos.

Diante das limitações constatadas para o gene 16S rRNA, o gene *housekeeping gyrB* foi utilizado para esclarecer as relações filogenéticas entre

isolados de *Aeromonas* estreitamente relacionados. Comparando a análise das sequências desses dois genes, foi verificado que intra-espécies o *gyrB* tem uma taxa média de divergência nucleotídica em torno de nove vezes maior que o 16S rRNA e inter-espécies essa diferença foi em torno de quatro vezes maior. Além disso, entre as sequências do *gyrB* as taxas de divergência intra-espécies não ultrapassaram as taxas de divergência inter-espécies e com isso todas as espécies identificadas se situaram em ramos independentes da árvore filogenética e a maioria dos nós apresentaram altos valores de *bootstrap*, o que traz maior confiabilidade aos resultados.

Alguns resultados divergentes foram observados com as análises dos genes 16S rRNA e *gyrB*. Essas diferenças podem ser explicadas pelo fato do gene *gyrB* apresentar uma maior diversidade nucleotídica entre as espécies, e além disso, não apresentar microheterogeneidades, uma vez que possui única cópia no genoma (Sawada *et al.*, 1999; Martens *et al.*, 2008). Essas características aumentam o poder discriminatório do gene *gyrB* para estudos taxonômicos do gênero *Aeromonas*.

A análise do valor do *cut off* de 97% de identidade entre as sequências do gene *gyrB* (Yanez *et al.*, 2003) revelou que com exceção de 593 e 294, todos os isolados pertencem a alguma espécie conhecida do gênero *Aeromonas*, incluindo os outros dez isolados cuja espécie não ficou claramente definida pela árvore filogenética baseada nas sequências desse gene (272, 285, 253, 270, 359, 345, 287, 260, 279 e 347).

Por sua vez, a análise da proteína GyrB mostrou-se insuficiente para discriminação de espécies estreitamente relacionadas (*A. aquariorum* e *A. trota*). A diferença entre os cronômetros evolutivos: gene *gyrB* e proteína GyrB, é

explicada pelo fato de que o gene embora relativamente conservado, por codificar uma proteína *housekeeping*, é sujeito a um código degenerativo que permite que mutações mais silenciosas ocorram, assim diferentes códons podem codificar o mesmo aminoácido (Yanez *et al.*, 2003). Desse modo, diferentes espécies de *Aeromonas* apresentaram as mesmas sequências de aminoácidos, fazendo com que a análise filogenética baseada na proteína GyrB não representasse uma boa ferramenta para avaliar a taxonomia dos isolados estudados.

Como foi verificado, os genes 16S rRNA e *gyrB* são marcadores evolutivos não-sincronizados. O 16S rRNA é um marcador bem mais conservado que os genes *housekeeping*, entretanto é considerado a base para taxonomia de procariotos (Roger *et al.*, 2012a). A sequência desse gene apresenta regiões variáveis que diferenciam a maioria das espécies de *Aeromonas*. Já o *gyrB*, com seu alto nível de divergência nucleotídica, é um marcador bastante útil para elucidar relações entre espécies do gênero *Aeromonas* e principalmente entre aquelas estreitamente relacionadas (Yanez *et al.*, 2003, Saavedra *et al.*, 2006; Vega-Sánchez *et al.*, 2014). Nesse estudo foi aproveitada a capacidade de ambos os relógios moleculares a fim de melhorar a confiabilidade da inferência filogenética do gênero *Aeromonas*. Para isso foi gerada uma árvore filogenética baseada nas sequências concatenadas dos dois genes.

Com base nas sequências concatenadas dos genes 16S rRNA-*gyrB*, 117 isolados de *Aeromonas* agruparam com seis espécies do gênero na árvore filogenética. Entre os isolados clínicos três espécies foram mais prevalentes: *A. caviae*, seguida por *A. veronii* e *A. aquariorum*. As duas primeiras são frequentemente descritas na literatura como agentes de diarreia (Janda e Abbott 2010; Senderovich *et al.* 2012). *A. aquariorum*, desde que foi descrita por

Martinez-Murcia *et al.* (2008), tem se tornado clinicamente relevante, prevalendo na Austrália e Malásia sobre as espécies clínicas dominantes, *A. caviae* e *A. veronii* (Aravena-Roman *et al.*, 2011; Puthucheary *et al.*, 2012). Já espécie *A. hydrophila*, geralmente muito associada a gastroenterites (Puthucheary *et al.*, 2012; Wejdan, *et al.*, 2014), teve apenas dois isolados clínicos identificados nesse estudo. Outro achado importante foi a identificação das espécies *A. trota* e *A. jandaei* entre os isolados clínicos, pois essas espécies são raramente relatadas na literatura e mais ainda em amostras de pacientes com diarreia.

Quanto aos isolados ambientais, ao contrário de outros trabalhos que identificaram *A. veronii* como espécie mais prevalente (Hu, *et al.*, 2012; Roger *et al.* 2012b), neste estudo só foram identificadas as espécies *A. caviae* e *A. hydrophila*, sendo a primeira a mais prevalente. A estreita relação observada na análise filogenética entre alguns isolados clínicos e ambientais de *A. caviae* sugerem uma provável infecção por água contaminada.

Os isolados 294 e 593, que nas árvores filogenéticas do *gyrB* e do 16SrRNA-*gyrB* foram claramente diferenciados das espécies de *Aeromonas* relatadas na literatura até o momento, provavelmente representam espécies ainda desconhecidas desse gênero. Apesar disso, outros estudos são necessários para comprovar se esses isolados correspondem realmente a novas espécies.

Na árvore gerada a partir das sequências concatenadas dos genes 16S rRNA e *gyrB*, a grande maioria dos isolados (98,3%) agrupou com cepas de referência, quando comparado com as árvores geradas com base nas sequências separadas desses genes. Também foi verificado um agrupamento mais definido entre isolados da espécie *A. veronii*.

Além disso, diferenças em relação a posição e profundidade de alguns ramos levaram a árvore de sequências concatenadas a refletir melhor o modelo de evolução das espécies, observado em estudos baseados em *Multilocus Phylogenetic Analysis* (MLPA). O MLPA é amplamente utilizado para inferência evolutiva do gênero *Aeromonas* (Aravena-Roman, *et al.*, 2013; Lóren, *et al.*, 2014). Apesar deste método ser bastante robusto, utiliza geralmente fragmentos de cinco ou mais genes *housekeeping* para gerar seus resultados, sendo portanto mais dispendioso do que a análise do 16SrRNA-*gyrB*.

As sequências do gene 16S rRNA quando analisadas separadamente foram insuficientemente discriminatórias para espécies estreitamente relacionadas. Todavia quando combinadas com as sequências do *gyrB*, demonstraram ser bastante úteis para estudos filogenéticos do gênero *Aeromonas*. A partir dos resultados gerados neste estudo, para assegurar não só a verdadeira identidade das espécies, mas também suas relações evolutivas, é proposta a construção de árvores com sequências combinadas de ambos os genes, 16S rRNA e *gyrB*. Esse tipo de análise nunca foi realizada para o gênero *Aeromonas*.

O uso do sequenciamento de genes, especialmente os genes *housekeeping*, é considerado hoje como técnica padrão ouro para a correta identificação de espécies de *Aeromonas* (Figueras *et al.*, 2011b), mas ainda assim ferramentas como o RFLP e testes fenotípicos são utilizadas para essa função (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Puthuchearry *et al.*, 2012).

Analisando os isolados previamente tipados pelo RFLP do 16S rRNA (Mendes-Marques *et al.*, 2012), aproximadamente 17% deles foram identificados como espécies diferentes daquelas observadas neste estudo pela análise

filogenética dos genes 16SrRNA-*gyrB*. Falsas identificações e também padrões atípicos de RFLP já foram descritos na literatura para o gênero *Aeromonas* e geralmente ocorrem devido a presença de heterogeneidades intragenômicas nas regiões de atuação das enzimas de restrição (Puthucheary *et al.*, 2012; Vega-Sánchez *et al.*, 2014).

Muitos testes fenotípicos são necessários para identificação de espécies de *Aeromonas*, e mesmo assim falsos resultados são muito frequentes (Park *et al.*, 2003; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010). Nesse estudo, mais de 26% dos isolados identificados por testes fenotípicos apresentaram resultados diferentes em relação a identificação das espécies observadas pela análise filogenética dos genes 16SrRNA-*gyrB*, uma porcentagem de diferenças maior do que a observada para o RFLP. A comparação entre esses resultados revelou que a identificação por testes fenotípicos subestimou a ocorrência da espécie *A. caviae*. Ao contrário, para espécie *A. veronii*, a prevalência de isolados foi superestimada em um valor duas vezes maior. Isso mostra que o desconhecimento da real prevalência dessas espécies pode ter ocorrido ao longo dos anos, quando esses testes eram utilizados, muitas vezes como única forma de identificação das espécies do gênero.

Tratando-se da espécie *A. aquariorum*, não fosse o conhecimento das sequências dos genes (16S rRNA e *gyrB*), não se saberia da existência dessa espécie entre os isolados estudados, já que tanto o RFLP quanto os testes fenotípicos classificaram seus isolados como outras espécies de *Aeromonas* (*A. caviae* e *A. veronii*). Em parte isso pode ter ocorrido pelo desconhecimento dessa espécie, que só foi publicada em 2008 (Martinez-Murcia *et al.*, 2008).

Os resultados dessa comparação reforçam a necessidade da utilização do sequenciamento de genes e outras ferramentas que tragam maior confiabilidade para identificação de espécies de *Aeromonas*. A análise filogenética de sequências concatenadas dos genes 16S rRNA e *gyrB* mostrou ser uma ferramenta eficiente para esclarecer a taxonomia do gênero.

A rede filogenética construída, utilizando o algoritmo eBURST, permitiu estruturar a população de *Aeromonas* obtida durante o surto de diarreia e elucidar as relações evolutivas entre genótipos intimamente relacionados como os das espécies *A. caviae*, *A. aquariorum* e *A. trota*. Por ser um marcador mais conservado, o 16S rRNA pode ser utilizado para essa análise, pois o eBURST trabalha com sequências com poucas variações nucleotídicas. Essa análise foi realizada com sequências do *gyrB*, mas não foi obtido sucesso, devido a grande variação nucleotídica entre as sequências. Com isso, não foram identificados pelo algoritmo o genótipo fundador e seus descendentes.

Em muitos casos, como foi observado nessa análise, o genótipo fundador é também o que apresenta maior prevalência de isolados e isso fornece maior confiabilidade a atribuição desse genótipo como fundador primário da população. No diagrama gerado, foi observado, além do genótipo fundador, genótipos fundadores de subgrupos (G7, G39 e G50), pois é comum que alguns genótipos descendentes do fundador primário aumentem em frequência e depois diversifiquem para gerar genótipos variantes próprios (Feil *et al.*, 2004).

Observando os genótipos que foram se ligando para fora do diagrama, como a sequência "G51-G7-G39-G22", identificamos o acúmulo de mutações, assim foi possível acompanhar como cada genótipo evoluiu dentro da população e com quais outros genótipos se relacionou exatamente. Essas observações

difícilmente seriam obtidas pela análise de uma árvore filogenética tradicional. Esses polimorfismos que dão origem a genótipos variantes dentro de uma mesma espécie são provavelmente microheterogeneidades nas cópias do operon do 16S rRNA dos isolados, que acabam deturpando as árvores filogenéticas tradicionais geradas a partir das sequências desse gene.

Foi verificado que muitos genótipos foram desvinculados da rede filogenética, tidos como genótipos satélites. Além das diferenças nucleotídicas comuns existentes entre as espécies, a presença de microheterogeneidades intraespecíficas contribuiu para geração desse tipo de genótipo.

A análise da rede filogenética gerada pelo eBURST, forneceu padrões de descendência evolutiva entre espécies *A. trota* e *A. aquariorum* que apresentaram genótipos estreitamente relacionados à espécie *A. caviae*, sugerindo que o processo de especiação está em curso. A observação das sequências do 16S rRNA dos genótipos fundadores e descendentes permitiu identificar exatamente quais as substituições nucleotídicas que diferenciam os isolados dessas três espécies. Foi verificado que apesar das heterogeneidades intraespecíficas existentes, mutações pontuais são capazes de distinguir as espécies de *Aeromonas*. Tal fato pode ser confirmado, uma vez que com exceção do G11 (*A. bestiarum* ATCC 13444^T e *A. piscicola* CECT 7443^T), não houve genótipo que comportasse isolados de espécies diferentes, nem mesmo entre os genótipos satélites.

É interessante destacar que as cepas *A. bestiarum* ATCC 13444^T e *A. piscicola* CECT 7443^T, únicas espécies que apresentaram mesmo genótipo de acordo com o eBURST e apresentaram também taxas de divergência nucleotídica de 2,4% entre as sequências do gene *gyrB*, valor menor que o *cut-off* (3%)

utilizado na literatura para diferenciar as espécies por meio das sequências desse gene. Esses resultados sugerem que essas cepas não possuem diferenças suficientes para serem consideradas espécies distintas.

O diagrama gerado pelo eBURST apontou para uma estrutura populacional epidêmica, incluindo quase todos os isolados de *A. caviae*, com um genótipo comum e provavelmente bem adaptado ligado a múltiplos genótipos variantes e menos frequentes. Pelo que se sabe até o momento, trabalhos desse tipo, utilizando o gene 16S rRNA, não foram realizados para o gênero *Aeromonas*. A variação de genótipos observada dentro de cada espécie pode significar o possível surgimento de cepas especializadas via processo de pressão seletiva existente em nichos mais estreitos.

Diante dessas constatações, podemos concluir que apesar das sequências do gene 16S rRNA não serem muito esclarecedoras quando analisadas isoladamente em árvores filogenéticas tradicionais, elas podem fornecer importantes informações evolutivas dentro do gênero *Aeromonas*, através da construção de redes filogenéticas, que retratam melhor os eventos de reticulação ocorridos dentro de uma população.

A patogenicidade de *Aeromonas* spp. é complexa e multifatorial, podendo envolver produtos de um grande número de genes, agindo isoladamente ou em conjunto (Galindo *et al.*, 2006; Sha *et al.*, 2002). O gene *alt* foi detectado na maioria dos isolados desse estudo (81,5%) e com exceção de *A. jandaei*, foi detectado em todas as espécies de *Aeromonas* identificadas. Esse resultado difere daquele reportado por Senderovich *et al.*, (2012), que detectaram esse gene em apenas 18% dos isolados de *Aeromonas* obtidos de fezes de pacientes com diarreia em Israel. Os genes *ast* e *hlyA*, por sua vez, foram detectados em

baixas frequências, 13,4% e 11,8%, respectivamente. Frequências maiores para *ast* (18,8%) e *hlyA* (28,1%) foram verificadas entre isolados de pacientes com diarreia na Espanha (Pablos *et al.*, 2010).

Os genes *ast* e *hlyA* só foram detectados entre isolados de *A. caviae*, *A. aquariorum* e *A. hydrophila*, o que pode ser um diferencial na virulência relacionada à diarreia para essas espécies. Interessantemente, um estudo realizado com 20 dos isolados de *A. caviae* utilizados nesse trabalho, revelou a expressão de um provável fator diarreiogênico: uma enterotoxina citotóxica termoestável. Nesse estudo, sobrenadantes de culturas de 70% dos isolados de *A. caviae* induziram ao acúmulo de líquido em alças intestinais de coelhos e camundongos e demonstraram atividade citotóxica em cultura de células, Lopes *et al.* (Comunicação pessoal, 2014).

Tendo em vista a prevalência das espécies de *Aeromonas* entre isolados obtidos durante o surto de diarreia ocorrido em São Bento do Una, foi realizada uma avaliação da distribuição de sete genes de virulência entre os isolados. Assim, os resultados da detecção dos genes *alt*, *ast* e *hlyA*, foram somados aos resultados da detecção de quatro genes de virulência, *aerA*, *exu*, *lip* e *flaA/B* (Mendes-Marques *et al.*, 2012). Tal avaliação forneceu importantes informações, uma vez que são poucos os estudos detalhando o potencial de virulência entre as espécies do gênero *Aeromonas*.

Foi verificado um elevado potencial de virulência entre os isolados de *Aeromonas* deste estudo, uma vez que a grande maioria deles apresentou quatro ou mais dos genes de virulência analisados e todos apresentaram pelo menos um desses genes. Se considerado o número de genes de virulência detectados entre a maioria dos isolados, *A. hydrophila* e *A. aquariorum*, teriam um maior potencial

de virulência entre as espécies identificadas, seguidas pelas espécies *A. caviae* e *A. veronii*.

Esse trabalho demonstrou que diferentes subgrupos de genes de virulência existem entre as espécies de *Aeromonas*, contudo entre as 29 combinações de genes observadas, 19 foram exclusivas de determinadas espécies do gênero. Além disso, algumas espécies claramente apresentaram determinados perfis de virulência como os mais frequentes entre os seus isolados.

Relatos na literatura sugerem que alguns genes de virulência de *Aeromonas* atuam sinergicamente e são razoáveis preditores de diarreia humana. A presença simultânea dos genes *alt* e *ast*, que está associada a ocorrência de diarreia aquosa severa (Albert *et al.*, 2000), foi verificada em 12 isolados (10,1%), sendo oito de *A. caviae*, três de *A. hydrophila* e um de *A. aquariorum*. Em estudo realizado por Aguilera-Arreola *et al.*, (2007), a ocorrência de *alt*⁺/*ast*⁺ foi verificada em 7,3% dos isolados. A presença de ambos os genes *aerA* e *hlyA*, ocorreu em dez isolados (8,4%), sendo seis de *A. aquariorum*, três de *A. hydrophila* e um de *A. caviae*. Diante das características das toxinas AerA e HlyA acredita-se que elas possam atuar sinergicamente contribuindo para diarreia humana (Heuzenroeder *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003), contudo poucos estudos investigam a presença dos genes *aerA* e *hlyA* simultaneamente. Pablo *et al.*, (2010) detectaram *aerA*⁺/*hlyA*⁺ em 4,5% do total de isolados estudados e exclusivamente na espécie *A. hydrophila*.

A presença de isolados *alt*⁺/*ast*⁺ e *aerA*⁺/*hlyA*⁺, juntamente à elevada frequência de genes de virulência observada entre as espécies *A. hydrophila*, *A. aquariorum* e *A. caviae*, apontam para a potencial capacidade dessas três espécies em causar gastroenterites. A patogenicidade da espécie *A. hydrophila* já

é bem discutida na literatura (Albert *et al.*, 2000; Hu, *et al.*, 2012), entretanto estudos desse tipo para as espécies *A. caviae* e *A. aquariorum*, são pouco frequentes. Diante da elevada prevalência das espécies *A. caviae* e *A. aquariorum* verificada nesse e em outros trabalhos (Prediger *et al.*, 2012; Puthucheary *et al.*, 2012), e a grande ocorrência de genes de virulência observada, são sugeridos estudos mais detalhados sobre a patogenicidade dessas duas espécies.

A ampla distribuição de genes de virulência entre isolados ambientais verificada nesse trabalho foi também discutida em estudo realizado por Hu *et al.*, (2012). Tal fato constitui um problema para saúde pública, uma vez que cepas potencialmente virulentas de *Aeromonas* podem ser transferidas para organismos aquáticos e humanos, e possivelmente causar doenças.

De acordo com a distribuição dos isolados de *Aeromonas* obtidos de fezes de pacientes com diarreia no município de São Bento do Una, podemos observar dentro da amostragem utilizada, a aglomeração de isolados no perímetro urbano, onde provavelmente tiveram início os casos de diarreia e a partir daí se disseminaram para as áreas rurais. Como esperado, a espécie *A. caviae* foi a mais prevalente tanto entre isolados obtidos de pacientes de áreas urbanas como de pacientes de áreas rurais. Achados discrepantes foram observados para a espécie *A. veronii* que teve prevalência cerca de 10 vezes maior entre os isolados obtidos de áreas rurais do que de áreas urbanas. Já para a espécie *A. aquariorum* a prevalência foi semelhante nas duas áreas. *A. hydrophila* e *A. trota* só foram identificadas em áreas urbanas e *A. jandaei* em áreas rurais, dentro da amostragem utilizada.

Entre os isolados de *A. caviae*, tanto de áreas urbanas, quanto de áreas rurais, o genótipo fundador (G51) foi o mais frequentemente identificado. Já para *A. veronii* os isolados apresentaram genótipos diferentes entre as áreas rurais e urbanas. Entre os isolados de *A. aquariorum* dois genótipos prevaleceram tanto em áreas urbanas, quanto de áreas rurais. Quanto aos perfis de virulência: entre os isolados de *A. caviae*, obtidos de áreas urbanas e rurais, o perfil de virulência mais frequente foi o mesmo, já para espécie *A. veronii* os perfis de virulência mais frequentes entre os isolados de áreas rurais e urbanas foram diferentes, e o mesmo aconteceu para *A. aquariorum*.

Diante dos resultados dessa análise é possível observar que no geral *A. caviae* pareceu ser a espécie que apresentou características mais homogêneas entre os isolados obtidos de pacientes residentes em diferentes áreas do município. Esses achados corroboram com a estrutura populacional revelada na rede filogenética que abrigou quase todos os isolados (91%) de *A. caviae*, demonstrando a estreita relação, inclusive entre isolados clínicos e ambientais dessa espécie, também verificada em árvores filogenéticas.

Essas observações somadas à elevada prevalência de *A. caviae* entre os isolados clínicos quando comparada a outras espécies, e até mesmo a outros gêneros bacterianos identificados em amostras do surto, além do potencial de virulência verificado entre os isolados dessa espécie, sugerem que *A. caviae* pode ter sido responsável por muitos dos casos de diarreia ocorridos no município de São Bento do Una, Pernambuco.

7. Conclusões

- Os resultados desse estudo confirmaram que o gene *gyrB* é um eficiente marcador taxonômico para espécies de *Aeromonas*;
- A análise das sequências concatenadas dos genes 16SrRNA e *gyrB* revelou-se uma ferramenta eficiente para correta identificação de espécies do gênero *Aeromonas* analisadas neste estudo;
- As análises filogenéticas sugerem que dois isolados constituem duas novas espécies do gênero *Aeromonas* ainda não descritas na literatura;
- A rede filogenética construída com base nas sequências do gene 16S rRNA revelou uma estrutura populacional epidêmica, envolvendo quase todos os isolados de *A. caviae* como genótipo fundador;
- Foi detectado elevado potencial de virulência entre as espécies de *Aeromonas* identificadas nesse estudo, principalmente entre *A. hydrophila*, *A. aquariorum* e *A. caviae*;
- As características marcantes de prevalência, filogenia e virulência observadas entre os isolados de *A. caviae* sugerem que essa espécie teve importante participação no surto de diarreia do município de São Bento do Una, Pernambuco;
- Os resultados desse estudo enfatizam a importância do monitoramento das espécies desse gênero de bactérias no ambiente.

8. Referências

- Abbott SL, Cheung WK, and Janda JM (2003) The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol* 41: 2348-2357.
- Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez C, Zúñiga G, Figueras MJ, Garduño RA and Castro-Escarpulli G (2007) Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: a comparative study. *Can J Microbiol* 53: 877-887.
- Albert MJ, Ansaruzzaman M, Talukder KA, Chopra AK, Kuhn I, Rahman M, Faruque AS, Islam MS, Sack RB and Mollby R (2000) Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J Clin Microbiol* 38: 3785-3790.
- Ali A, Carnahan AM, Altwegg M, Lüthy-Hottstein J and Joseph SW (1996) *Aeromonas bestiarum* sp. nov., (formerly genomospecies DNA group 2 *A. hydrophila*), a new species isolated from non human sources. *Med Microbiol Lett* 5: 156-165.
- Allen DA, Austin B and Colwell RR (1983) *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *Int J Syst Bacteriol* 33: 599-604.
- Alperi A, Figueras MJ, Inza I and Martínez-Murcia AJ (2008) Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. *Int Microbiol* 11:185-194.
- Alperi A, Martínez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ and Figueras MJ (2010a) *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a Spanish river. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 72-77.
- Alperi A, Martínez-Murcia AJ, Ko WC, Monera A, Saavedra MJ and Figueras MJ (2010b) *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., clinical species from Taiwan. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2048-2055.
- Aravena-Román M, Harnett GB, Riley TV, Inglis TJ and Chang BJ (2011) *Aeromonas aquariorum* is widely distributed in clinical and environmental specimens and can be misidentified as *Aeromonas hydrophila*. *J Clin Microbiol* 49: 3006-3008.
- Aravena-Román M, Beaz-Hidalgo R, Inglis TJ, Riley TV, Martínez-Murcia AJ, Chang BJ and Figueras MJ (2013) *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:2270-2276.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Sideman J, Smith J and Struhl, K (1987) *Current Protocol in Molecular Biology*.
- Barracough TG and Nee S (2001) Phylogenetics and speciation. *Trends Ecol Evol* 16: 391-399.
- Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Figueras MJ and Romalde JL (2009) *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Syst Appl Microbiol* 32: 471-479.
- Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Buján N, Romalde JL and Figueras MJ (2010) Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst Appl Microbiol* 33 :149-153.

- Borchardt MA, Stemper ME and Standridge JH (2003) *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis. *Emerg Infect Dis* 9: 224-228.
- Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ and Martínez-Murcia AJ (1997) Identification of *Aeromonas* Clinical Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. *J Clin Microbiol* 35:1671-1674.
- Bossi-Ku"pfer, M, Genini A, Peduzzi R, and Demarta A (2007) Tracheobronchitis caused by *Aeromonas veronii* biovar *sobria* after near-drowning. *J Med Microbiol.* 56:1563-1564.
- Boucher Y, Douady CJ, Sharma AK, Kamekura M and Doolittle WF (2004) Intragenomic heterogeneity and intergenomic recombination among haloarchaeal rRNA genes. *J Bacteriol* 186: 3980-3090.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y and Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535.
- Carnahan A, Fanning GR and Joseph SW (1991a) *Aeromonas jandaei* (formally genospecies DNA group 9 *Aeromonas sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 29: 560-564.
- Carnahan A, Chakraborty T, Fanning GR, Verma D, Ali A, Janda JM and Joseph SW (1991b). *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 29: 1206-1260.
- Carvalho MJ, Martínez-Murcia AJ, Esteves AC, Correia A and Saavedra MJ (2012) Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. *Intern J Food Microbiol.* 159: 230-239.
- Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF and Kjelleberg S (2007) Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* 73:278-288.
- Ceylana E, Berktaş M, Korkocab H, Kelesa I, Bozkurtb H and Kurtoglu MG (2003). Prevalence and antibiotic sensitivity of motile *Aeromonas* in Dogs. *Acta Vet Brno* 72: 607-612.
- Chacón MR, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro Jand Figueras MJ (2002) A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 44: 221-225.
- Chai B, Wang H and Chen X (2012) Draft genome sequence of high-melanin-yielding *Aeromonas media* strain WS. *J Bacteriol* 194: 6693-6694.
- Chen PL, Tsai PJ, Chen CS, Lu YC, Chen HM, Lee NY, Lee CC, Li CW, Li MC, Wu CJ *et al.* (2014) *Aeromonas* stool isolates from individuals with or without diarrhea in southern Taiwan: Predominance of *Aeromonas veronii*. *J Microbiol Immunol Infect.* xx: 1-7.
- Chopra AK, Pham R and Houston CW (1994) Cloning and expression of putative cytotoxic enterotoxin-encoding genes from *Aeromonas hydrophila*. *Gene* 139: 87-91.
- Chopra AK, Peterson JW, Xu XJ, Coppenhaver DH and Houston CW (1996) Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog* 21: 357-377.
- Coenye T and Vandamme P (2003) Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiol Lett* 228: 45-49.

- Coenye T, Gevers D, Van de Peer Y, Vandamme P and Swings J (2005) Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol Rev* 29: 147-167.
- Collins MD, Martínez-Murcia AJ and Cai J (1993) *Aeromonas enteropelogenes* and *Aeromonas ichthiosmia* are identical to *Aeromonas trola* and *Aeromonas veronii*, respectively, as revealed by small-subunit rRNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 43: 855-856.
- Colwell RR, Macdonell MT and De Ley J (1986) Proposal to recognize the family Aeromonadaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 36: 473-477.
- Demarta A, Kupfer M, Riegel P, Harf-Monteil C, Tonollo M, Peduzzi R, Monera A, Saavedra MJ and Martínez-Murcia AJ (2008). *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Syst Appl Microbiol* 31: 278-286.
- Di Pinto A, Terio V, Di Pinto P and Tantillo G (2012) Detection of potentially pathogenic *Aeromonas* isolates from *ready-to-eat* seafood products by PCR analysis. *Int J Food Sci Tech* 47:269–273.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32:1792-1797.
- Esteve C, Gutiérrez MC and Ventosa A (1995). *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *Int J Syst Bacteriol* 45: 462-466.
- Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP and Spratt BG (2004) eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 186:1518-1530.
- Figueras MJ, Soler L, Chacón MR, Guarro J and Martínez-Murcia AJ (2000) Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 6: 2069-2073.
- Figueras MJ, Alperi A, Beaz-Hidalgo R, Stackebrandt E, Brambilla E, Monera A and Martínez-Murcia AJ (2011a) *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 242-248.
- Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R, Collado L and Martínez-Murcia AJ (2011b) Recommendations for a new bacterial species description based on analyses of the unrelated genera *Aeromonas* and *Arcobacter*. *Bull BISMIS* 2: 1-16.
- Fontes MC, Saavedra MJ, Martins C and Martínez-Murcia AJ (2011) Phylogenetic identification of *Aeromonas* from pigs slaughtered for consumption in slaughterhouses at the North of Portugal. *Int J Food Microbiol* 146: 118-122.
- Fukushima M, Kakinuma K and Kawaguchi R (2002) Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. *J Clin Microbiol* 40: 2779-2785.
- Galindo CL, Gutierrez C J and Chopra AK (2006) Potential involvement of galectin-3 and SNAP23 in *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin-induced host cell apoptosis. *Microb Pathog* 40: 56-68.
- Gao X, Jian J, Li WJ, Yang YC, Shen XW, Sun ZR, Wu Q and Chen GQ (2013) Genomic study of polyhydroxyalkanoates producing *Aeromonas hydrophila* 4AK4. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 9099-9109.
- Gavín R, Rabaan AA, Merino S, Tomás JM, Gryllos I and Shaw JG (2002) Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol Microbiol* 43: 383-397.
- Ghenghesh KS, Ahmed SF, El-Khalek RA, Al-Gendy A and Klena J (2008) *Aeromonas*-associated infections in developing countries. *J Infect Dev Ctries* 2: 81-98.

- Gordon L, Cloeckeaert A, Doublet B, Schwarz S, Bouju-Albert A, Ganière JP, Le Bris H, Le Flèche-Matéos A and Giraud E (2008) Complete sequence of the floR-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. J Antimicrob Chemother 62: 65-71.
- Griffin PJ, Sniezsko SF and Fridle SB (1953) A more comprehensive description of *Bacterium salmonicida*. Transactions American Fisheries Society, 82. 129-138.
- Guerra IMF, Fadenelli R, Figueiró M, Schreiner F, Delamare APL, Wollheim C, Costa SOP and Echeverrigaray S (2007) *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. Braz J Microbiol 38: 638-643.
- Gunderson JH, Sogin ML, Wollett G, Hollingdale M, de la Cruz VF, Waters AP and McCutchan TF (1987) Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in Plasmodium. Science 238: 933-937.
- Gusfield D, Hickerson D and Eddhu S (2007) An efficiently computed lower bound on the number of recombinations in phylogenetic networks: Theory and empirical study. Discrete Appl Math 155: 806-830.
- Hänninen ML and Hirvelä-Koski V (1999) Genetic diversity of atypical *Aeromonas salmonicida* studied by pulsed-field gel electrophoresis. Epidemiol Infect 123: 299-307.
- Harf-Monteil C, Le Flèche A, Riegel P, Prévost G, Bermond D, Grimont PAD and Monteil H (2004). *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. Int J Syst Evol Microbiol 54: 481-485.
- Hasan, J, Berger P, Stelma G, Sinclair J and Sen K (2006) *Aeromonas*: Human Health Criteria Document. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water. Office of science and Technology, Washington 184 pp.
- Hashimoto JG, Stevenson BS and Schmidt TM (2003) Rates and consequences of recombination between rRNA operons. J Bacteriol 185: 966-972.
- Heddle J and Maxwell A (2002) Quinolone-binding pocket of DNA gyrase: role of GyrB. Antimicrob Agents Chemother 46: 1805-1815.
- Heuzenroeder MW, Wong CY and Flower RL (1999) Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. FEMS Microbiol Lett 174: 131-136.
- Hickman-Brenner FW, MacDonald KL, Steigerwalt AG, Fanning GR, Brenner DJ and Farmer JJ 3rd (1987) *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. J Clin Microbiol 25: 900-906.
- Hickman-Brenner FW, Fanning GR, Arduino MJ, Brenner DJ and Farmer JJ 3rd (1988) *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. J Clin Microbiol 26: 1561-1564.
- Hill KR, Caselitz FH and Moody LM (1954) A case of acute, metastatic, myositis caused by a new organism of the family: Pseudomonadaceae; a preliminary report. West Indian Med J 3: 9-11.
- Hofer E, Reis CMF, Theophilo GND, Cavalcanti VO, Lima NV and Henriques MFCM (2006) Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop 39:217-220.

- Horneman AJ, Ali A and Abbott SL (2007) *Aeromonas*. In Murray PR, Baron EJ, Landry ML, Jorgensen JH and Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology, 9th edition. ASM Press. Washington pp. 715-722.
- Hu M, Wang N, Pan ZH, Lu CP and Liu YJ (2012) Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China. *Lett Appl Microbiol* 55: 224-233.
- Huang WM (1996) Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Annu Rev Genet* 30:79-107.
- Huson DH and Bryant D (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 23: 254-267.
- Huys G, Coopman R, Janssen P and Kersters K (1996) High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* 46: 572-580.
- Huys G, Kämpfer P, Altwegg M, Kersters I, Lamb A, Coopman R, Lüthy-Hottenstein J, Vancanneyt M, Jansen P and Kersters K (1997). *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int J Syst Bacteriol* 47: 1165-1171.
- Huys G, Cnockaert M and Swings J (2005) *Aeromonas culicicola* Pidiyar et al. 2002 is a later subjective synonym of *Aeromonas veronii* Hickman-Brenner et al. 1987. *Syst Appl Microbiol* 28: 604-609.
- Janda JM and Abbott SL (2010) The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev* 23:35-73.
- Joseph SW and Carnahan AM (2000) Update on the genus *Aeromonas*. *ASM News* 66: 218-223.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120.
- Küpfer M, Kuhnert P, Korczak BM, Peduzzi R and Demarta A (2006) Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2743-275.
- Lampel KA (2012) *Aeromonas* species. In: Lampel KA, Al-Khaldi S and Cahill SM (eds). *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*, 2nd edition, pp 54-56.
- Leal NC, Sobreira M, Leal-Balbino TC, de Almeida AM, de Silva MJ, Mello DM, Seki LM and Hofer E (2004) Evaluation of a RAPD-based typing scheme in a molecular epidemiology study of *Vibrio cholerae* O1, Brazil. *J Appl Microbiol* 96:447-454.
- Li Y, Liu Y, Zhou Z, Huang H, Ren Y, Zhang Y, Li G, Zhou Z and Wang L (2011) Complete genome sequence of *Aeromonas veronii* strain B565. *J Bacteriol* 193: 3389-3390.
- Libisch B, Giske CG, Kovács B, Tóth TG and Füzi M (2008) Identification of the First VIM Metallo- β -Lactamase-Producing Multiresistant *Aeromonas hydrophila* Strain. *J Clin Microbiol* 46: 1878-1880.
- Lorén JG, Farfán M and Fusté MC (2014) Molecular phylogenetics and temporal diversification in the genus *Aeromonas* based on the sequences of five housekeeping genes. *PLoS One* 9:e88805.
- Mackie GA (2013) RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay. *Nat Rev Microbiol* 11: 45-57.
- Marchandin H, Teyssier C, Siméon De Buochberg M, Jean-Pierre H, Carriere C and Jumas-Bilak E (2003) Intra-chromosomal heterogeneity between the four

- 16S rRNA gene copies in the genus *Veillonella*: implications for phylogeny and taxonomy. *Microbiology* 149: 1493-1501.
- Martens M, Dawyndt P, Coopman R, Gillis M, De Vos P and Willems A (2008) Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol* 58:200-214.
- Martin-Carnahan A and Joseph SW (2005) *Aeromonadaceae*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Springer-Verlag, New York, pp.556-578.
- Martinez-Murcia AJ, Benlloch S and Collins MD (1992a) Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int J Syst Bacteriol* 42: 412-421.
- Martínez-Murcia AJ, Esteve C, Garay E and Collins MD (1992b). *Aeromonas allosacharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett* 91: 199-206.
- Martínez-Murcia AJ, Saavedra MJ, Mota VR, Maier T, Stackebrandt E and Cousin S (2008) *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1169-1175.
- Martínez-Murcia A, Beaz-Hidalgo R, Svec P, Saavedra MJ, Figueras MJ and Sedlacek I (2013) *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. *Curr Microbiol* 66: 197-204.
- Martínez O, Rodríguez-Calleja JM, Santos JA, Otero A and García-López ML (2009) Foodborne and indicator bacteria in farmed molluscan shellfish before and after depuration. *J Food Prot* 72:1443-1449.
- Martino ME, Fasolato L, Montemurro F, Rosteghin M, Manfrin A, Patarnello T, Novelli E and Cardazzo B (2011) Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. *Appl Environ Microbiol* 77: 4986-5000.
- Mathur R and Adlakha N (2014) Linear programming model to construct phylogenetic network for 16S rRNA sequences of photosynthetic organisms and influenza viruses. *Interdiscip Sci* 6: 100-107.
- McMahon MAS and Wilson IG (2001) The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *Int. J. Food Microbiol* 70:155-162.
- Mendes-Marques CL, Nascimento LM, Theophilo GN, Hofer E, Melo Neto OP and Leal NC (2012) Molecular characterization of *Aeromonas* spp. and *Vibrio cholerae* O1 isolated during a diarrhea outbreak. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 54:299-304.
- Mendes-Marques CL, Hofer E and Leal NC (2013) Development of duplex-PCR for identification of *Aeromonas* species. *Rev Soc Bras Med Trop* 46: 355-357.
- Merino S, Shaw JG and Tomás JM (2006) Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS Microbiol Lett* 263: 127-135.
- Miñana-Galbis D, Farfan M, Fuste MC and Loren JG (2004) *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 2073-2078.
- Miñana-Galbis D, Farfan M, Fuste MC (2007). *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 582-587.

- Miñana-Galbis D, Farfán M, Lorén JG and Fusté MC (2010) Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. *Syst Appl Microbiol* 33: 15-19.
- Miyata M, Aoki T, Inglis V, Yoshida T and Endo M (1995) RAPD analysis of *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*. *J Appl Bacteriol* 79: 181-185.
- Morandi A, Zhaxybayeva O, Gogarten JP and Graf J (2005). Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. *J Bacteriol* 187: 6561-6564.
- Moreno C, Romero J and Espejo RT (2002) Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*. *Microbiology* 148: 1233-1239.
- Nawaz M, Khan SA, Khan AA, Sung K, Tran Q, Kerdahi K and Steele R (2010) Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiol* 27: 327-331.
- Ndi OL and Barton MD (2011) Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *J Fish Dis* 34: 589-599.
- Nei, M and Kumar, S (2000), Evolutionary change of amino acid sequences in *Molecular Evolution and Phylogenetics*, 17-32.
- Ormen O, Granum PE, Lassen J and Figueras MJ (2005) Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. *APMIS* 113: 203-207.
- Ottaviani D, Santarelli S, Bacchiocchi S, Masini L, Ghittino C and Bacchiocchi I (2006) Occurrence and characterization of *Aeromonas* spp. in mussels from the Adriatic Sea. *Food Microbiol* 23: 418-422.
- Overman TL and Janda JM (1999). Antimicrobial susceptibility patterns of *Aeromonas jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, and *A. veronii* biotype *veronii*. *J Clin Microbiol* 37: 706-708.
- Pablos M, Remacha MA, Rodríguez-Calleja JM, Santos JA, Otero A and García-López ML (2010) Identity, virulence genes, and clonal relatedness of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea and drinking water. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29: 1163-1172.
- Park TS, Oh SH, Lee EY, Lee TK, Park KH, Figueras MJ and Chang CL (2003) Misidentification of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* as *Vibrio alginolyticus* by the Vitek system. *Lett Appl Microbiol* 37: 349-353.
- Parker JL and Shaw JG (2011) *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *J Infect* 62:109-118.
- Pemberton JM, Kidd SP and Schmidt R (1997) Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett* 152: 1-10.
- Pereira CS, Amorim SD, Santos AFM, Reis CMF, Theophilo GND and Rodrigues DP (2008) Characterization of *Aeromonas* spp isolates from newborns hospitalized. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 179-182.
- Popoff M and Véron M (1976) A Taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. *J Gen Microbiol* 94: 11-22.
- Popoff M (1984) *Aeromonas*. In: Krieg NR and Holt JG (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st edition. Williams and Wilkins. Baltimore, pp. 545-548.
- Prediger KD, Pereira Rda S, Winckler Neto CH, Santos RC, Fadel-Picheth CM and Vizzotto BS (2012) A prospective study on *Aeromonas* in outpatients

- with diarrhea in the central region of Rio Grande do Sul State. *Braz J Microbiol* 43: 966-968.
- Pridgeon JW, Zhang D and Zhang L (2014a) Complete Genome Sequence of the Highly Virulent *Aeromonas hydrophila* AL09-71 Isolated from Diseased Channel Catfish in West Alabama. *Genome Announc* 2: e00450-14.
- Pridgeon JW, Zhang D and Zhang L (2014b) Complete Genome Sequence of a Moderately Virulent *Aeromonas hydrophila* Strain, pc104A, Isolated from Soil of a Catfish Pond in West Alabama. *Genome Announc* 5: e00554-14.
- Puthuchery SD, Puaah SM and Chua KH (2012) Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. *PLoS One* 7:e30205.
- Qu F, Bao CM, Cui EB, Shi JB, Guo TS and Mao YL (2005) Detection of multiresistance *Aeromonas* with TEM type resistant genes in patients with cirrhosis. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 19: 43-45.
- Reith ME, Singh RK, Curtis B, Boyd JM, Bouevitch A, Kimball J, Munholland J, Murphy C, Sarty D, Williams J, *et al.* (2008) The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics* 19: e427.
- Roger F, Lamy B, Jumas-Bilak E, Kodjo A, colBVH study group and Marchandin H (2012a) Ribosomal multi-operon diversity: an original perspective on the genus *Aeromonas*. *PLoS One*. 7: e46268.
- Roger F, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Kodjo A; colBVH study group and Lamy B (2012b) Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution. *BMC Microbiol* 12: 62-85.
- Saavedra MJ, Figueras MJ and Martínez-Murcia AJ (2006) Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2481-2487.
- Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Sawada H, Suzuki F, Matsuda I and Saitou N (1999) Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster. *J Mol Evol* 49:627-644.
- Schubert RHW and Hegazi M (1988) *Aeromonas eucrenophila* species nova *Aeromonas caviae* a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol, Hyg*, 268: 34-39.
- Senderovich Y, Ken-Dror S, Vainblat I, Blau D, Izhaki I and Halpern M (2012) A molecular study on the prevalence and virulence potential of *Aeromonas* spp. recovered from patients suffering from diarrhea in Israel. *PLoS One* 7:e30070.
- Sepe A, Barbieri P, Peduzzi R and Demarta A (2008) Evaluation of *recA* sequencing for the classification of *Aeromonas* strains at the genotype level. *Lett Appl Microbiol* 46: 439-444.
- Seshadri R, Joseph SW, Chopra AK, Sha J, Shaw J, Graf J, Haft D, Wu M, Ren Q, Rosovitz MJ *et al.* (2006) Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. *J Bacteriol* 188: 8272-8282.
- Sha J, Kozlova EV and Chopra AK (2002) Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infect Immun* 70: 1924-1935.
- Soler L, Marco F, Vila J, Chacón MR, Guarro J and Figueras MJ (2003) Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for

- identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp. J Clin Microbiol 41: 5732-5734.
- Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM and Feil EJ (2004) Displaying the relatedness among isolates of bacterial species -- the eBURST approach. FEMS Microbiol Lett 241:129-134.
- Staden R, Beal KF and Bonfield JK (2000) The Staden package, 1998. Methods Mol Biol 132:115-130.
- Stainer RY (1943) A note on the taxonomy of *P. hydrophilus*. J Bacteriol, 46: 213-214.
- Szczuka E and Kaznowski A (2004) Typing of Clinical and Environmental *Aeromonas* sp. Strains by Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR, and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence PCR. Clin Microbiol 42: 220-228.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28:2731-2739.
- Tekedar HC, Waldbieser GC, Karsi A, Liles MR, Griffin MJ, Vamenta S, Sonstegard T, Hossain M, Schroeder SG, Khoo L *et al.* (2013) Complete Genome Sequence of a Channel Catfish Epidemic Isolate, *Aeromonas hydrophila* Strain ML09-119. Genome Announc 1: e00755-13.
- Vásquez A, Molin G, Pettersson B, Antonsson M and Ahrné S (2005) DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. Syst Appl Microbiol 28: 430-441.
- Vega-Sánchez V, Latif-Eugenín F, Soriano-Vargas E, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ, Aguilera-Arreola MG and Castro-Escarpulli G (2014) Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and β -lactamase genes. Vet Microbiol 172: 528-533.
- Vila J, Ruiz J, Gallardo F, Vargas M, Soler L, Figueras MJ and Gascon J (2003). *Aeromonas* spp. and traveler`s diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. Emerg Infect Dis 9: 552-555.
- Vivekanandhana G, Hathab AAM and Lakshmanaperumalsamy P (2005) Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in fish and prawns from the seafood market of Coimbatore, South India. Food Microbiol 22: 133-137.
- von Graevenitz A (2007) The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. Infection 35: 59-64.
- Vos M, Quince C, Pijl AS, de Hollander M and Kowalchuk GA (2012) A comparison of rpoB and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. PLoS One 7: e30600.
- Voss LM, Rhodes KH and Johnson KA (1992) Musculoskeletal and soft tissue *Aeromonas* infection: an environmental disease. Mayo Clin Proc 67:422-427.
- Wang G, Clark CG, Liu C, Pucknell C, Munro CK, Kruk TM, Caldeira R, Woodward DL and Rodgers FG (2003) Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. J Clin Microbiol 41: 1048-1054.
- Wang LT, Lee FL, Tai CJ and Kasai H (2007) Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. Int J Syst Evol Microbiol 57: 1846-1850.

- Wejdan RTA, Abeer FA, Oruba KHA and Noor SN (2014) PCR Detection of Putative Hemolysin and Aerolysin Genes in An *Aeromonas Hydrophila* Isolates from Diarrhea in Babylon Province. *Journal of Natural Sciences Research* 4:41-47.
- Woese CR (1987) Bacterial Evolution. *Microbiol Rev* 51: 221–271.
- Wong CY, Heuzenroeder MW, and Flower RL (1998) Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiology* 144:291-298.
- Yáñez MA, Catalán V, Apráiz D, Figueras MJ and Martínez-Murcia AJ (2003) Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on gyrB gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:875-883.
- Zamborsky DJ and Nishiguchi MK (2011) Phylogeographical patterns among Mediterranean sepiolid squids and their *Vibrio symbionts*: environment drives specificity among sympatric species. *Appl Environ Microbiol* 77: 642-649.

9. Anexos

9.1 Sequências de cepas de referência utilizadas nesse estudo e seus respectivos números de acesso

Cepas	16S rRNA N° de acesso GenBank	gyrB N° de acesso GenBank
<i>A. molluscorum</i> LMG 22214	AY987772.1	AY987538.1
<i>A. tecta</i> CECT 7082	HQ832416.1	HQ442662.1
<i>A. media</i> ATCC 33907	X74679.1	AF417627._1
<i>A. eucrenophila</i> ATCC 23309	X74675.1	AF417629.1
<i>A. encheleia</i> CECT 4342	HQ832414.1	Ay101799.1
<i>A. popoffii</i> CECT 5176	HQ832415.1	AY101801.1
<i>A. bestiarum</i> ATCC 13444	AY987755.1	AY987521.1
<i>A. piscicola</i> CECT 7443	HQ832417.1	HQ442690.1
<i>A. schubertii</i> ATCC 43700	X60416.2	AF417628._1
<i>A. simiae</i> MDC 2374	GQ860944.1	GQ860942.1
<i>A. jandaei</i> ATCC 49568	X60413.2	AF242651.3
<i>A. trota</i> ATCC 49657	X60415.2	AF417633.1
<i>A. salmonicida</i> CECT 894	Ay987751.1	JN711820.1
<i>A. allosaccharophila</i> CECT 4199	S39232.2	HQ442733.1
<i>A. aquariorum</i> MDC 47	EU085557.2	EU268444.1
<i>A. diversa</i> CECT 4254	GQ365710.1	HQ442756.1
<i>A. rivuli</i> DSM 22539	FJ976900.1	FJ969434.1
<i>A. bivalvium</i> 868E	NR_043885.1	EF465525.1
<i>A. fluvialis</i> 717	FJ230078.2	FJ603455.1
<i>A. sobria</i> JCM 2139	AB472942.1	AB473084.1
<i>A. sanarellii</i> A2-67	FJ230076.1	FJ807277.1
<i>A. taiwanensis</i> A2-50	FJ230077.1	FJ807272.1
<i>A. cavernicola</i> MDC 2508	HQ436040.1	HQ442702.1
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311	NR_119108.1	EU014643.1

Disponível na base de dados, GenBank/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

9.2 Isolados de *Aeromonas* e respectivas coordenadas geográficas de latitude e longitude (graus, minutos e segundos)

Isolado	espécie	Coordenadas geográficas
252	<i>A. caviae</i>	S 8 31 28.2 W 36 26 09.1
253	<i>A. veronii</i>	S 8 34 98.0 W 36 28 18.0
256	<i>A. aquariorum</i>	S 8 37 00.1 W 36 23 68.8
257	<i>A. aquariorum</i>	S 8 31 02.5 W 36 26 02.8
258	<i>A. aquariorum</i>	S 8 31 36.3 W 36 26 10.0
259	<i>A. veronii</i>	S 8 36 84.7 W 36 25 05.2
261	<i>A. caviae</i>	S 8 31 05.5 W 36 25 56.6
262	<i>A. caviae</i>	S 8 32 12.4 W 36 26 52.5
263	<i>A. caviae</i>	S 8 31 39.3 W 36 26 52.6
265	<i>A. caviae</i>	S 8 31 49.2 W 36 25 70.2
266	<i>A. caviae</i>	S 8 38 87.0 W 36 29 56.4
267	<i>A. jandaei</i>	S 8 29 42.7 W 36 22 63.8
268	<i>A. caviae</i>	S 8 31 04.5 W 36 25 58.9
269	<i>A. caviae</i>	S 8 31 50.0 W 36 25 73.3
270	<i>A. veronii</i>	S 8 31 49.2 W 36 25 70.2
272	<i>A. veronii</i>	S 8 28 14.1 W 36 27 05.5
274	<i>A. caviae</i>	S 8 30 68.6 W 36 31 00.5
275	<i>A. caviae</i>	S 8 37 67.0 W 36 30 00.8
276	<i>A. caviae</i>	S 8 38 89.5 W 36 29 58.3
277	<i>A. caviae</i>	S 8 31 11.2 W 36 26 34.7
279	<i>A. veronii</i>	S 8 30 68.9 W 36 31 00.5
280	<i>A. aquariorum</i>	S 8 31 57.8 W 36 26 54.4
281	<i>A. veronii</i>	S 8 31 08.5 W 36 25 49.6
283	<i>A. aquariorum</i>	S 8 34 84.0 W 36 31 02.7
284	<i>A. hydrophila</i>	S 8 31 06.3 W 36 26 02.8
285	<i>A. veronii</i>	S 8 25 43.1 W 36 27 64.1
286	<i>A. aquariorum</i>	S 8 31 01.9 W 36 26 00.3
287	<i>A. veronii</i>	S 8 37 67.0 W 36 30 00.8
288	<i>A. caviae</i>	S 8 31 08.3 W 36 26 37.3
289	<i>A. caviae</i>	S 8 30 59.6 W 36 26 41.7
292	<i>A. caviae</i>	S 8 31 05.6 W 36 23 53.9
293	<i>A. caviae</i>	S 8 34 61.2 W 36 26 62.3
294	<i>Aeromonas</i> spp.	S 8 31 02.6 W 36 25 56.7
295	<i>A. caviae</i>	S 8 31 48.9 W 36 26 59.9
296	<i>A. aquariorum</i>	S 8 28 57.7 W 36 20 31.6
298	<i>A. veronii</i>	S 8 31 31.1 W 36 26 22.6
299	<i>A. caviae</i>	S 8 31 05.5 W 36 25 52.5
300	<i>A. caviae</i>	S 8 35 56.6 W 36 28 99.6
302	<i>A. caviae</i>	S 8 31 11.0 W 36 25 49.7
305	<i>A. trota</i>	S 8 31 00.2 W 36 26 00.9
308	<i>A. caviae</i>	S 8 31 57.5 W 36 26 53.9
309	<i>A. caviae</i>	S 8 26 55.8 W 36 26 39.6
366	<i>A. caviae</i>	S 8 31 07.6 W 36 25 56.8
370	<i>A. trota</i>	S 8 31 07.1 W 36 26 47.0
371	<i>A. trota</i>	S 8 31 08.5 W 36 26 27.8
372	<i>A. caviae</i>	S 8 31 08.8 W 36 26 45.2
373	<i>A. caviae</i>	S 8 31 54.5 W 36 26 54.2
374	<i>A. caviae</i>	S 8 30 37.8 W 36 26 18.0

Coordenadas GMS referentes aos locais onde residiam os pacientes dos quais os isolados foram obtidos, no município de São Bento do Una, Pernambuco.

9.3 Diferentes perfis de genes de virulência encontrados entre 119 isolados de *Aeromonas*

Perfil de virulência	Genes positivos	Isolado	Espécie
aerA ⁻ exu ⁻ lip ⁻ fla ⁻ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁻	alt	261	<i>A. caviae</i>
aerA ⁻ exu ⁻ lip ⁺ fla ⁻ alt ⁻ ast ⁻ hlyA ⁻	lip	330	<i>A. caviae</i>
aerA ⁻ exu ⁺ lip ⁻ fla ⁻ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁻	exu alt	251 308	<i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i>
aerA ⁻ exu ⁻ lip ⁺ fla ⁻ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁻	lip alt	275 277	<i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i>
aerA ⁻ exu ⁺ lip ⁻ fla ⁺ alt ⁻ ast ⁻ hlyA ⁻	exu fla	334	<i>A. caviae</i>
aerA ⁻ exu ⁻ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁻	lip fla alt	262 264 341 344 345	<i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i> <i>A. veronii</i> <i>A. veronii</i>
aerA ⁻ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁻ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁻	exu lip alt	263 302 319 324 327 331 332	<i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i>
aerA ⁻ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁻ ast ⁻ hlyA ⁻	exu lip fla	274 326 373	<i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i>
aerA ⁻ exu ⁺ lip ⁻ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁻	exu fla alt	293 309 317 356	<i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i> <i>A. trota</i>
aerA ⁺ exu ⁺ lip ⁻ fla ⁺ alt ⁻ ast ⁻ hlyA ⁻	aer exu fla	305 337 370	<i>A. trota</i> <i>A. jandaei</i> <i>A. trota</i>
aerA ⁺ exu ⁺ lip ⁻ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁻	aer exu fla alt	371	<i>A. trota</i>
aerA ⁻ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁻	exu lip fla alt	252 266 276 288 289 292 295 299 301 304 314 315 316 318 323 325 431	<i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i>

Continuação

Perfil de virulência	Genes positivos	Isolado	Espécie
aerA ⁻ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁻	exu lip fla alt	254	<i>A. caviae</i>
		255	<i>A. caviae</i>
		268	<i>A. caviae</i>
		355	<i>A. caviae</i>
		374	<i>A. caviae</i>
		439	<i>A. caviae</i>
		455	<i>A. caviae</i>
		463	<i>A. caviae</i>
		579	<i>A. caviae</i>
		652	<i>A. caviae</i>
aerA ⁺ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁻ ast ⁻ hlyA ⁻	aer exu lip fla	707	<i>A. caviae</i>
		253	<i>A. veronii</i>
		260	<i>A. veronii</i>
		267	<i>A. jandaei</i>
		270	<i>A. veronii</i>
		272	<i>A. veronii</i>
		279	<i>A. veronii</i>
		282	<i>A. veronii</i>
		287	<i>A. veronii</i>
		294	<i>Aeromonas</i> spp.
359	<i>A. veronii</i>		
aerA ⁻ exu ⁺ lip ⁻ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁺	exu fla alt hlyA	296	<i>A. aquariorum</i>
aerA ⁻ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁻ ast ⁺ hlyA ⁻	exu lip fla ast	300	<i>A. caviae</i>
		362	<i>A. caviae</i>
		364	<i>A. caviae</i>
aerA ⁻ exu ⁻ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁺ hlyA ⁻	lip fla alt ast	339	<i>A. caviae</i>
aerA ⁺ exu ⁻ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁻	aer lip fla alt	340	<i>A. caviae</i>
		343	<i>A. caviae</i>
		349	<i>A. caviae</i>
aerA ⁺ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁻ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁻	aer exu lip alt	354	<i>A. caviae</i>
		367	<i>A. veronii</i>
		593	<i>Aeromonas</i> spp.
aerA ⁻ exu ⁺ lip ⁻ fla ⁺ alt ⁻ ast ⁺ hlyA ⁺	exu fla ast hlyA	363	<i>A. aquariorum</i>
aerA ⁻ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁻ alt ⁺ ast ⁺ hlyA ⁻	exu lip alt ast	437	<i>A. caviae</i>
aerA ⁺ exu ⁻ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁺	aer lip fla alt hlyA	256	<i>A. aquariorum</i>
		278	<i>A. aquariorum</i>
aerA ⁺ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁻	aer exu lip fla alt	257	<i>A. aquariorum</i>
		259	<i>A. veronii</i>
		265	<i>A. caviae</i>
		269	<i>A. caviae</i>
		280	<i>A. aquariorum</i>
		281	<i>A. veronii</i>
		285	<i>A. veronii</i>
		298	<i>A. veronii</i>
		322	<i>A. caviae</i>
		335	<i>A. caviae</i>
		342	<i>A. caviae</i>
		346	<i>A. veronii</i>
		347	<i>A. veronii</i>
		350	<i>A. caviae</i>
		352	<i>A. caviae</i>

Continuação

Perfil de virulência	Genes positivos	Isolado	Espécie
aerA ⁺ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁻	aer exu lip fla alt	353 358 366 372 475 596	<i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i>
aerA ⁺ exu ⁺ lip ⁻ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁺	aer exu fla alt hlyA	284	<i>A. hydrophila</i>
aerA ⁺ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁻ alt ⁺ ast ⁺ hlyA ⁻	aer exu lip alt ast	338	<i>A. caviae</i>
aerA ⁻ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁺ hlyA ⁻	exu lip fla alt ast	360 420 429	<i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i> <i>A. caviae</i>
aerA ⁺ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁻ hlyA ⁺	aer exu lip fla alt hlyA	258 283 286 291	<i>A. aquariorum</i> <i>A. aquariorum</i> <i>A. aquariorum</i> <i>A. aquariorum</i>
aerA ⁻ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁺ hlyA ⁺	exu lip fla alt ast hlyA	361 462	<i>A. aquariorum</i> <i>A. hydrophila</i>
aerA ⁺ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁺ hlyA ⁻	aer exu lip fla alt ast	336	<i>A. caviae</i>
aerA ⁺ exu ⁺ lip ⁺ fla ⁺ alt ⁺ ast ⁺ hlyA ⁺	aer exu lip fla alt ast hlyA	313 428 464	<i>A. hydrophila</i> <i>A. caviae</i> <i>A. hydrophila</i>

1 **9.4 Artigo a ser submetido para a revista PLOS ONE**

2
3
4 **Molecular characterization of clinical and environmental isolates of**
5 ***Aeromonas* species recovered during a diarrhea outbreak**

6
7 Livia Christina A. da Silva^{1,2*}, Carina L. Mendes-Marques¹, Antônio M. Rezende¹, Nilma
8 C. Leal¹, Tereza Cristina Leal-Balbino¹

9
10 ¹ Department of Microbiology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz),
11 Recife, PE, Brazil

12
13 ²Department of Genetics, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil
14

15 * Corresponding author:
16 E-mail: liviacalves@yahoo.com.br (LCAS)
17

Abstract

37

38 *Aeromonas* species are waterborne gram-negative bacteria and are implicated in a variety
39 of human infections, mainly gastroenteritis. Since their role as etiologic agents of bacterial
40 diarrhea is still questioned, in the present study, 119 clinical and environmental isolates of
41 *Aeromonas* obtained from a diarrhea outbreak in northeast Brazil were investigated in
42 terms of species prevalence, genetic structure of the population and virulence potential.
43 The phylogenetic analysis based on concatenated sequences of the 16S rRNA and *gyrB*
44 genes showed the predominance of *A. caviae* (66.4%), followed by *A. veronii* (14.2%); *A.*
45 *aquariorum* (9.2%); *A. trota* (3.4%); *A. hydrophila* (3.4%) and *A. jandaei* (1.7%). Two
46 isolates were not identified among the known species of *Aeromonas*, suggesting they may
47 belong to new species. A Phylogenetic network built based on 16S rRNA gene sequences
48 indicated an epidemic population structure, involving almost all isolates of *A. caviae*. The
49 analyses of the combinations of seven virulence genes (*alt*, *ast*, *hlyA*, *aerA*, *exu*, *lip*,
50 *flaA/B*) revealed that some species present clearly determined “virulence patterns” as the
51 most frequent among their isolates. The combination of both molecular clocks 16S rRNA
52 and *gyrB* proved to be an efficient tool for taxonomic studies of the genus *Aeromonas*. The
53 high virulence potential and the close phylogenetic relationships observed for the *A. caviae*
54 isolates pointed that this species may have been a causative agent of diarrhea in patients
55 involved in the outbreak in northeast Brazil.

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

Introduction

66

67 The genus *Aeromonas* belongs to the family *Aeromonadaceae* and comprises a
68 group of gram-negative bacteria, common inhabitants of aquatic environments, that
69 includes species implicated in humans and animals infections. The gastroenteritis are the
70 most common clinical manifestations of *Aeromonas* infections in humans. *Aeromonas*-
71 associated diarrhea is a worldwide phenomenon seen in both industrialized and developing
72 countries, spanning all age groups and it can be found in healthy or suffering from
73 immunological disorder persons [1], [2].

74 The *Aeromonas* taxonomy is complex and has undergone continuous changes due
75 to the new species described and the introduction of new diagnostic criteria [3]. Analyses
76 based on 16S rRNA gene sequencing are universally accepted as an appropriate tool to
77 establish phylogenetic relationships within of bacterial genera [4], [5]. However, in case of
78 *Aeromonas*, some authors have been suggesting that the high identity of the 16S rRNA
79 nucleotide sequences between the species and the presence of intragenomic heterogeneity
80 among the 16S *rrn* operons copies can affect the taxonomy of this genus [3], [6]. Due to
81 these reports, housekeeping genes like *gyrB* have been used to the taxonomic inference of
82 the genus *Aeromonas* [7]. Also in the field of phylogeny, phylogenetic networks have
83 recently gained importance for genetic diversity studies in bacterial populations [8], [9] but
84 such studies are scarce for *Aeromonas*.

85 The pathogenesis of *Aeromonas* spp. involves a wide group of virulence
86 determinants and their roles not being conclusively established for any human infections
87 [10], [11]. The literature shows that the occurrence of genes encoding cytotoxic
88 enterotoxin (*hlyA*), cytotoxic heat-labile (*alt*) and cytotoxic heat-stable (*ast*) enterotoxins,
89 may contribute to diarrhea-related virulence [12], [13], [14]. Other virulence factors such

90 as aerolysin, flagellins, lipases and DNAses have also been identified in isolates of
91 *Aeromonas* from aquatic environments and stools of patients suffering diarrhea [15], [16].

92 Hofer et al. [17] reported a diarrhea outbreak in a city of northeast Brazil, where
93 *Aeromonas* spp. were the most frequent sole pathogen isolated from stools of patients
94 suffering acute diarrhea (114/145; 78.6%), with *Vibrio cholera* O1 also being recovered in
95 a substantially smaller number (18/145; 12,4%). Homogeneous ISR and RAPD profile
96 implicated *V. cholera* O1 as the etiological agent of the outbreak [18]. However, the high
97 prevalence of *Aeromonas* spp. pointed the need of a more detailed study of these isolates.
98 The aim of this research was to identify the species of *Aeromonas* by using a combination
99 gene analysis of 16S rRNA and *gyrB* and to analyze the genetic structure of the population
100 and the virulence potential of 119 clinical and environmental isolates obtained during the
101 diarrhea outbreak in northeast Brazil.

102

103 **Materials and Methods**

104 **Bacterial strains and DNA extraction**

105 A total of 119 isolates of *Aeromonas* were used in this study. They were identified to
106 genus level by biochemical characterizations [17]. The origin of these isolates was as follows:
107 103 isolates were obtained from stools of patients involved in the diarrhea outbreak and 16
108 isolates from aquatic environments were also obtained during the outbreak period. Clinical
109 isolates were identified by numbers ranging from 251 to 374 and environmental isolates were
110 identified by numbers ranging from 420 to 707. The reference strains *A. hydrophila* ATCC
111 7966^T, *A. veronii* ATCC 35624^T and *A. caviae* ATCC 15468^T were used as controls. The
112 cultures had been preserved at -80°C in brain heart infusion (BHI) plus 25% glycerol. The
113 cultures were transferred to another tube BHI and incubated at 37°C for 24 h. Bacterial

114 suspensions were used for DNA extraction according to the method described by Ausubel et
 115 al. [19], and adapted by Leal et al. [20]

116

117 **Molecular identification of *Aeromonas* species**

118 The 119 isolates were identified at the species level based on the sequencing of 16S
 119 rRNA and *gyrB* genes. PCR amplifications for both genes were performed in accordance
 120 with previous reports [7], [21]. The amplicons (approximately 1503 bp fragment of 16S
 121 rRNA and 1100 bp fragment of *gyrB*) were purified using ExoSAP-IT PCR Cleanup
 122 (Affymetrix, Cleveland, OH) following the user's manual. The purified products were
 123 sequenced on an Applied Biosystems 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA) using
 124 PCR primers and internal primers (Table 1). Each nucleotide sequence was determined at
 125 least twice to confirm readings and to resolve ambiguities. Sequence assembly and editing
 126 were performed using tools (Pregap4 and Gap4) of the Staden package [22].

127 **Table 1. Sequences of the primers used to phylogenetic and virulence potential**
 128 **analyses.**

129

PRIMER	SEQUENCE(5'-3')	REFERÊCE
Phylogenetic genes		
<i>PCR primers</i>		
16S rRNAF	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	Borrell et al. [21]
16S rRNAR	GGTACCTTGTACGACTT	Borrell et al. [21]
<i>gyrB</i> 3F	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	Yáñez et al. [7]
<i>gyrB</i> 14R	TTGTCCGGGTTGTACTCGTC	Yáñez et al. [7]
<i>Internal primers</i>		
16S BF	AGCAGTGGGGAATATTGCAC	This study
16S BR	GGCAACAAAGGACAGGGGT	This study
16S CF	ACGCAGGCGGTTGGATAAGT	This study
16S CR	AAATCGACATCGTTTACGGCG	This study
16S DF	AACCTTACCTGGCCTTGACA	This study
16S DR	CACACACGCGGCATGGTGCATC	This study
<i>gyrB</i> 9Rs	CCTTGACCGAAATGACCGCC	Yáñez et al. [7]
<i>gyrB</i> 7F	GGGGTCTACTGCTTACCAA	Yáñez et al. [7]
<i>gyrB</i> 9R	ACCTTGACGGAGATAACGGC	Yáñez et al. [7]
Virulence genes		
<i>hlyAF</i>	GGCCGGTGGCCCGAAGATACGGG	Heuzenroeder et al. [13]
<i>hlyAR</i>	GGCGGCGCCGGACGAGACGGG	Heuzenroeder et al. [13]
<i>altF</i>	CCATCCCCAGCCTTTACGCCAT	Martínez et al. [30]
<i>altR</i>	TTTACCGAGGTGACGCCGT	Martínez et al. [30]
<i>astF</i>	ATGCACGCACGTACCGCCAT	Martínez et al. [30]
<i>astR</i>	ATCCGGTCGTCGCTCTTGGT	Martínez et al. [30]

130 A 1454 bp sequence of 16S rRNA and a 920 bp sequence of *gyrB* were used in the
131 final analysis. These partial gene sequences were aligned (both independently and as a
132 concatenated sequence of 2374 bp) using Muscle program [23] with those from *Aeromonas*
133 reference strains representing published species to date. For analysis that needed outgroup
134 rooting, *Salmonella enterica* ATCC 13311^T was chosen because, despite belonging to
135 another taxonomic group, it is closely related with *Aeromonas*. All GenBank accession
136 numbers of the sequences included in this study are listed in the S1 Table.

137 Genetic distances and clustering were determined using Kimura's 2-parameter
138 model [24] and phylogenetic trees were generated by neighbor-joining method [25] with
139 MEGA program, version 5 [26]. Neighbor-joining tree support was evaluated with 1000
140 bootstrap replicates.

141

142 **Population genetic analyses**

143 In order to demonstrate the ancestral-descendent relationships among the
144 genotypes of all isolates and reference strains of *Aeromonas*, a phylogenetic network was
145 constructed based on the 16S rRNA gene sequences using the eBURST version 3.0 tool
146 [27], [28]. Such population-level analyses have been primarily generated with allelic
147 Multilocus Sequence Analysis (MLST) data using eBURST algorithm but have also been
148 applied to single-gene nucleotide data obtained from isolates [8], [29].

149 To run the eBURST, first the columns with polymorphic sites were separated within
150 the 16S rRNA sequences alignment and a number N of base pairs was obtained equally
151 for all sequences. A matrix was generated, where the numbers from 1 to 4 replaced the
152 adenine (A), cytosine (C), thymine (T) and guanine (G) bases within the alignment. This
153 matrix was used as input for the eBURST program. The eBURST analysis was performed
154 using the default parameters. The network was defined as a group of closely related

155 genotypes, each one sharing a number N-1 of identical bases with at least one other
156 member of this network, all descended from a founding genotype.

157

158 **Detection of virulence genes**

159 The 119 isolates were subjected to PCR assays to detect three virulence genes (*alt*,
160 *ast* e *hlyA*) using the same primers and conditions previously described [13], [30]. The
161 sequence of each primer used to amplify the target genes (approximately 338 bp fragment
162 of *alt*, 260 bp fragment of *ast* and 597 bp fragment of *hlyA*) are listed in Table 1. To
163 confirm the identity of the amplified genes fragments, PCR products of three isolates from
164 the outbreak and the reference strain *A. hydrophila* ATCC 7966^T were sequenced using the
165 same PCR primers. Sequences were compared to those available in the GenBank database,
166 using the standard nucleotide-nucleotide BLAST program (BLASTN;
167 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

168 Other virulence genes (*aerA*, *exu*, *lip* and *flaA/B*) were previously investigated in
169 the same isolates of this study [18]. The presence of these genes plus the *alt*, *ast* and *hlyA*
170 genes was analyzed to determine the possible combinations among the isolates and thus
171 provide information more detailed about the virulence potential of *Aeromonas* species.

172

173 **Results**

174 **Phylotaxonomic**

175 A total of 146 sequences (119 isolates, 26 reference strains and outgroup rooting)
176 of both 16S rRNA and *gyrB* genes were examined in this study. The phylogenetic analysis
177 was inferred from concatenated sequences of the 16S rRNA and *gyrB* genes (2374 bp).
178 The neighbor-joining tree is shown in Fig. 1 and indicated a clear clustering of 117 isolates

179 with reference strains of six *Aeromonas* species. Phylogenetic identification results
180 revealed that *A. caviae* was the predominant specie with 79 isolates (66.4%), followed by
181 17 *A. veronii* (14.2%), 11 *A. aquariorum* (9.2%), 4 *A. hydrophila* (3.4%), 4 *A. trota* (3.4%)
182 and 2 *A. jandaei* (1.7%). All species formed independent branches in the tree and high
183 bootstrap values were observed. Finally, two isolates, 294 (clinical) and 593
184 (environmental) were clearly differentiated from related known species, forming
185 independent branches. *A. caviae* was the type strain that showed largest identity with the
186 593 isolate and *A. veronii* showed largest identity with the 294 isolate according the
187 relative branching order.

188

189 **Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree based on concatenated sequences of the 16S**
190 **rRNA an gyrB genes.** Relationships of type strains of *Aeromonas* species and 119 isolates
191 from the current study. *Salmonella enterica* was used as the outgroup. Nodes supported by
192 bootstrap values $\geq 50\%$ are indicated. The bar indicates 2% sequence divergence.

193

194 Only representative clusters of two species included environmental isolates: *A. caviae*
195 (13/16; 81.3%) and *A. hydrophila* (2/16; 12.5%). The clusters of six species included the
196 clinical isolates *A. caviae* (66/103; 64.1%), *A. veronii* (17/103; 16.5%) *A. aquariorum*
197 (11/103; 10.7%), *A. trota* (4/103; 3.9%), *A. hydrophila* (2/103; 1.9%) and *A. jandaei*
198 (2/103; 1.9%). Some clinical and environmental isolates of *A. caviae* exhibited close
199 relationship in the phylogenetic tree: 319, 354, 360, 437 and 439; 374 and 652; 255 and
200 475; 265 and 707.

201 Phylogenetic analyses were also performed for 16S rRNA and *gyrB* genes sequences
202 separately. A total of 31% and 11% of the isolates showed uncertain classification based
203 on 16S rRNA and *gyrB* phylogenetic trees, respectively.

204 **Population genetic analyses**

205 Columns of polymorphic sites extracted from the alignment resulted in 79 bp (N) for
206 each one of the 16S rRNA sequences of 119 isolates and 26 reference strains of
207 *Aeromonas*. Consequently, phylogenetic network was defined as a group of different
208 genotypes, each sharing 78 bp (N-1) identical with at least one other member of the
209 network.

210 According to eBURST, 145 *Aeromonas* sequences were grouped into 59 different
211 genotypes (G1 – G59). A total of 17 genotypes distributed among 84 isolates and three
212 reference strains were clustered in a network represented by a radial diagram, in which
213 each row represents a nucleotide substitution (Fig. 2). In addition, 42 genotypes distributed
214 among 35 isolates (all isolates of *A. veronii*, *A. hydrophila* and *A. jandaei*; seven isolates of
215 *A. caviae* and three of *A. trota*) and 23 reference strains were unlinked from the network
216 and denominated satellite genotypes (S2 Table).

217

218 **Fig. 2. Phylogenetic network (eBURST diagram).** Network built based on 16S rRNA
219 sequences (1454 nt), composed of 17 genotypes and encompassing 84 isolates and 3 type
220 strains of *Aeromonas* species. Each circle represents a different genotype. Primary founder
221 (blue) and subgroup founders are shown in yellow.

222

223 The phylogenetic network revealed the genotype G51 (blue circle), as the founder
224 genotype because it clustered to the largest number of variant genotypes. This genotype
225 appeared as the most frequent, in 44 *A. caviae* isolates (44/119; 37%) and in the *A. caviae*
226 ATCC 15468^T strain. The G51 is directly linked to eight variant genotypes (G6, G31,
227 G41, G50, G24, G5, G55 and G7). With exception of G50, represented by isolates of *A.*
228 *aquariorum*, the other genotypes are exclusive of *A. caviae*.

229 All genotypes with at least two descendants are considered founders of subgroups and
230 are represented on the diagram by yellow circles (G7, G39 and G50), represented by
231 isolates of *A. caviae*. The G39 is the second most frequent genotype (15 isolates; 12.6%).
232 Two descendent genotypes of the G39 presented polymorphisms that give rise to two
233 *Aeromonas* species closely related to *A. caviae*. The G53 is represented by five isolates of
234 *A. aquariorum* (256, 258, 283, 361 and 363) and *A. aquariorum* MDC 47 strain. This
235 genotype has a transition (A / G) at position 476 that differentiates it from *A. caviae* and *A.*
236 *trota* species. Genotype G42 is represented by one isolate of *A. trota* (356) and *A. trota*
237 ATCC 49657^T strain. The G42 presents a transition (G / A) at position 649 that
238 differentiates it from *A. caviae* and *A. aquariorum* species. This nucleotide substitution is
239 also present in three isolates of *A. trota* unlinked from the network (305, 370 and 371). The
240 G35 and G22 are represented by isolates of *A. caviae*.

241 The G50 (isolates 257, 286 and 296) and its descendent genotypes (G10, G20 and
242 G43) are exclusive of *A. aquariorum* specie and have the same polymorphism at position
243 476 present in G53 (another genotype of this specie).

244 Clinical and environmental isolates of *A. caviae* that showed close relationships in the
245 phylogenetic tree based on 16S rRNA and *gyrB* concatenated sequences present the same
246 genotypes in the phylogenetic network: 319, 354, 360, 437 and 439 (G51); 374 and 652
247 (G51); 255 and 475 (G7); 265 and 707 (G51).

248

249 **Detection of virulence genes**

250 Identity of the three genes fragments (*alt*, *ast* and *hlyA*) amplified from
251 representative isolates and one reference strain was confirmed through the sequencing. The
252 alignment with sequences deposited in the GenBank database resulted in 98 to 100%
253 identity with the corresponding genes of *Aeromonas*.

254 The *alt* gene showed high frequency among the *Aeromonas* isolates (97/119;
255 81.5%) and was amplified from five *Aeromonas* species: *A. hydrophila*, *A. aquariorum*; *A.*
256 *caviae*; *A. veronii* and *A. trota*. The *ast* and *hlyA* genes had much lower frequencies than
257 the *alt* gene, 13.4% (16/119) and 11.8% (14/119), respectively. These genes were detected
258 from isolates of *A. hydrophila*, *A. aquariorum* and *A. caviae*.

259 The distribution of seven associated virulence genes (*aerA*, *exu*, *lip*, *fla A/B*, *alt*, *ast*
260 and *hlyA*) among clinical and environmental *Aeromonas* species is summarized in Table 2.
261 All the isolates were positive for at least one of the virulence genes and 90 (90/119; 75.6%)
262 of them amplified four or more of these genes. In three isolates were detected the seven
263 genes (two environmental and one clinical).

264 The analysis of the combinations based on seven genes revealed 29 “virulence
265 patterns”. The combination *exu / lip / flaAB / alt* showed the higher frequency among the
266 isolates (23.5%), followed by *aerA / exu / lip / flaAB / alt* (17.6%) and *aerA / exu / lip /*
267 *flaAB* (8.4%). Certain species carried distinct sets of these virulence genes in combination.
268 This association was seen with *A. caviae* with *exu / lip / flaAB / alt* (28/79; 35.4%),
269 followed by *aerA / exu / lip / flaAB / alt* (13/79; 16.5%); *A. veronii* with *aerA / exu / lip /*
270 *flaAB* (8/17; 47%), followed by *aerA / exu / lip / flaAB / alt* (6/17; 35,3%); *A. aquariorum*
271 with *aerA / exu / lip / flaAB / alt / hlyA* (4/11; 36,4%). Two *A. hydrophila* isolates (2/4;
272 50%) were positives for the seven genes. *A. trota* and *A. jandaei* presented varied
273 “virulence patterns”.

274 Combination *alt*⁺/*ast*⁺ was detected in eight isolates of *A. caviae*, three of *A.*
275 *hydrophila* and one of *A. aquariorum*. In turn, the combination *aerA*⁺/*hlyA*⁺ was identified
276 in six isolates of *A. aquariorum*, three of *A. hydrophila* and one of *A. caviae*.

277
278
279
280
281

282 **Table 2. Distribution of associated virulence genes among 119 clinical and**
 283 **environmental isolates of *Aeromonas* species.**
 284

Species	Total isolates	<i>aerA</i>	<i>exu</i>	<i>lip</i>	<i>fla A/B</i>	<i>alt</i>	<i>ast</i>	<i>hlyA</i>	No. of isolates
Clinical									
<i>A. caviae</i>	66	-	-	-	-	+	-	-	1
		-	-	+	-	-	-	-	1
		-	+	-	-	+	-	-	2
		-	-	+	-	+	-	-	2
		-	+	-	+	-	-	-	1
		-	-	+	+	+	-	-	3
		-	+	+	-	+	-	-	7
		-	+	+	+	-	-	-	3
		-	+	-	+	+	-	-	3
		-	+	+	+	+	-	-	21
		-	+	+	+	-	+	-	3
		-	-	+	+	+	+	-	1
		+	-	+	+	+	-	-	3
		+	+	+	-	+	-	-	1
		+	+	+	+	+	-	-	11
		+	+	+	-	+	+	-	1
		-	+	+	+	+	+	-	1
		+	+	+	+	+	+	-	1
<i>A. hydrophila</i>	2	+	+	-	+	+	-	+	1
		+	+	+	+	+	+	+	1
<i>A. aquariorum</i>	11	-	+	-	+	+	-	+	1
		-	+	-	+	-	+	+	1
		+	-	+	+	+	-	+	2
		+	+	+	+	+	-	-	2
		+	+	+	+	+	-	+	4
		-	+	+	+	+	+	+	1
<i>A. trota</i>	4	-	+	-	+	+	-	-	1
		+	+	-	+	-	-	-	2
		+	+	-	+	+	-	-	1
<i>A. jandaei</i>	2	+	+	-	+	-	-	-	1
		+	+	+	+	-	-	-	1
<i>A. veronii</i>	17	-	-	+	+	+	-	-	2
		+	+	+	+	-	-	-	8
		+	+	+	-	+	-	-	1
		+	+	+	+	+	-	-	6
<i>Aeromonas spp.</i>	1	+	+	+	+	-	-	-	1
Environmental									
<i>A. caviae</i>	13	-	+	+	+	+	-	-	7
		-	+	+	-	+	+	-	1
		+	+	+	+	+	-	-	2
		-	+	+	+	+	+	-	2
		+	+	+	+	+	+	+	1
<i>A. hydrophila</i>	2	-	+	+	+	+	+	+	1
		+	+	+	+	+	+	+	1
<i>Aeromonas spp.</i>	1	+	+	+	-	+	-	-	1

285

286

287

288

Discussion

289

290 In several reported studies throughout the world *Aeromonas* species have been isolated
291 from patients with diarrhea and aquatic environments [16], [31], [32]. In current study, the
292 phylogenetic analysis based on concatenated sequences of the 16S rRNA and *gyrB* genes
293 revealed distinct clusterings of species with high bootstrap values. *A. caviae* was the most
294 prevalent specie among the clinical isolates, followed by *A. veronii* and *A. aquariorum*. *A.*
295 *caviae* and *A. veronii* are frequently described in the literature as diarrhea agents [2], [16].
296 Since that *A. aquariorum* was described for the first time by Martinez-Murcia et al. [33] it
297 has become a clinically relevant specie. This specie prevailed in Malaysia and Australia
298 above the typical dominating clinical species *A. caviae* and *A. veronii* [15], [34]. *A.*
299 *hydrophila*, usually associated with gastroenteritis [15], [35] had only two clinical isolates
300 identified in this study. Another important finding was the identification of *A. trota* and *A.*
301 *jandaei* among clinical isolates, since these species are rarely reported in the literature and
302 especially from samples of patients with diarrhea.

303 Unlike some studies that have identified *A. veronii* as the most prevalent specie among
304 environmental isolates [32], [36] in the current study only *A. caviae* e *A. hydrophila* were
305 identified among the water samples and the first one was the most prevalent. The close
306 phylogenetic relationships observed among some clinical and environmental isolates of
307 *Aeromonas* suggest waterborne infection.

308 The clinical (294) and environmental (593) isolates that formed independent
309 phylogenetic branch in the tree, probably represent unknown species of the genus
310 *Aeromonas*, however more detailed studies are needed to confirm this hypothesis.

311 The 16S rRNA and *gyrB* genes are quite different as evolutionary chronometers, non-
312 synchronized evolutionary markers. The 16S rRNA is far more conserved marker that
313 *gyrB* gene, however has variable regions that differ the most *Aeromonas* species [37]. The

314 *gyrB* gene, with its high level of nucleotide divergence, is an useful marker to elucidate
315 relationships between species of the genus *Aeromonas* and especially among those most
316 closely related [7]. The combination of both molecular clocks proved to be an efficient tool
317 for taxonomic studies of the genus *Aeromonas*.

318 The phylogenetic network built by eBURST algorithm pointed to an epidemic
319 population structure, including almost all isolates of *A. caviae*. The network presented a
320 common and probably well adapted genotype connected to multiple variant genotypes with
321 lesser frequencies. The predicted founder genotype (G51) was also the most prevalent
322 within the population and this provided added confidence to its assignment as primary
323 founder. In addition, founders of subgroups genotypes (G7, G39 and G50) were observed,
324 because is common that some descendants of the primary founder genotypes increase in
325 frequency and while doing so, begin to diversify to produce their own variant genotypes
326 [27].

327 Variant genotypes observed within each species may constitute the possible
328 emergence of specialized strains via process related to selective pressure within a narrow
329 niche. Polymorphisms that generated variant genotypes within of the species were
330 probably microheterogeneities in the operon copies of 16S rRNA, which may distort the
331 traditional phylogenetic trees derived from sequences of this gene. It was also observed
332 that many genotypes were unlinked from phylogenetic network, satellite genotypes. In
333 addition to the common nucleotide differences between species, the presence of
334 intraspecific microheterogeneities contributed to generation of such genotypes.

335 The network generated by eBURST provided patterns of evolutionary descent
336 among three *Aeromonas* species. The *A. trota* and *A. aquariorum* species showed
337 genotypes closely related with *A. caviae* genotypes, suggesting which the speciation is in
338 progress for this species. The 16S rRNA sequences analysis of the founder and

339 descendants genotypes indicated exactly which nucleotide substitutions that differentiate
340 the isolates of these three species. Despite the existing intraspecific heterogeneities, it was
341 observed that point mutations are able to distinguish *Aeromonas* species based on 16S
342 rRNA sequences. This fact can be confirmed, since with the exception of G11 (*A.*
343 *bestiarum* ATCC 13444^T and *A. piscicola* CECT 7443^T), no genotype included different
344 species, even among the satellite genotypes.

345 This study is the one the first to apply the 16S rRNA sequences for genotype network
346 analysis within the genus *Aeromonas*. The eBURST algorithm works with sequences with
347 few nucleotide variations, therefore the 16S rRNA gene can be used for this analysis, since
348 that it is a quite conserved marker. This analysis was performed with *gyrB* sequences, but
349 was not successful due to wide nucleotide variation.

350 The pathogenicity of *Aeromonas* spp. is complex and multifactorial, and may
351 involve the products of a number of different genes acting either alone or in concert [38],
352 [39]. *Aeromonas* may produce heat-labile (Alt) and heat-stable (Ast) cytotoxic enterotoxins
353 [38]. Sha et al. [14] demonstrated the role of the two enterotoxins in causing gastroenteritis
354 in a mouse model by developing isogenic mutants. Other potent virulence factor of
355 *Aeromonas* strains is the HlyA protein, which is closely related to aerolysin (AerA), both
356 of them being β -hemolytic, cytotoxic and enterotoxic [12], [13], [40].

357 In the present study, the *alt* gene was detected in the majority of *Aeromonas*
358 isolates (81.5%) and in all identified species, with exception of *A. jandaei*. By contrast, a
359 survey in Israel found this gene in only 18% of the *Aeromonas* isolates obtained from
360 patients with diarrhea [16]. In turn, we detected *ast* and *hlyA* genes in lower frequencies,
361 13.4% and 11.8%, respectively. Pablos et al. [31] reported *ast* and *hlyA* in 18.8 and 28.1%
362 of the *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea in Spain. The *ast* and *hlyA* genes

363 were only detected among isolates of *A. caviae*, *A. hydrophila* and *A. aquariorum*, which
364 can be a differential in the diarrhea-related virulence for these species.

365 In view of the true prevalence of *Aeromonas* species resulting from phylogentic
366 analysis of the 16S rRNA and *gyrB* genes, combinations of seven virulence genes were
367 evaluated among the 119 *Aeromonas* isolates. Therefore, the detection results of the *alt*, *ast*
368 and *hlyA* genes were added to the detection results of four virulence genes (*aerA*, *exu*, *lip*
369 and *flaA/B*), researched by Mendes-Marques et al. [18]. This analysis provided important
370 informations, since there are few studies approaching the potential virulence among
371 species of the genus *Aeromonas*.

372 High virulence potential was verified among the *Aeromonas* isolates. If we consider
373 the number of virulence genes detected among the majority of isolates, *A. hydrophila* and
374 *A. aquariorum* presented greater virulence potential between the identified species,
375 followed by *A. caviae* and *A. veronii* species.

376 Different subgroups of seven virulence genes were observed among the species,
377 however of the 29 identified combinations of genes, 19 of them were exclusive to certain
378 species of the genus. Additionally, some species showed clearly determined “virulence
379 patterns” as the most frequent among their isolates.

380 The *alt*⁺/*ast*⁺ and *aerA*⁺/*hlyA*⁺ combinations were detected in 12 (10.1%) and 10
381 (8.4%) isolates, respectively and from three species: *A. caviae*, *A. hydrophila* and *A.*
382 *aquariorum*. Aguilera-Arreola et al. [41] reported *alt*⁺/*ast*⁺ in 7.3% of the isolates from
383 Mexico and Spain. The results from Albert et al. [42] suggest that the product of both the
384 *alt* and *ast* genes may act synergistically to induce severe watery diarrhea. Pablos et al.
385 [31] detected *aerA*⁺/*hlyA*⁺ in 4.5% of all isolates analyzed and exclusively in *A. hydrophila*
386 specie. Features of both AerA and HlyA toxins pointed that are reasonable predictors of
387 human diarrhea [13].

388 The virulence features indicated the potential capacity of *A. caviae*, *A. hydrophila* and
389 *A. aquariorum* to cause gastroenteritis. The pathogenicity of *A. hydrophila* is well
390 discussed in the literature [32], [42] but this studies are uncommon for *A. caviae* and *A.*
391 *aquariorum*. These findings point the need of more detailed studies about the pathogenicity
392 of these two species.

393 The wide distribution of virulence genes among environmental isolates observed in
394 this study was also reported in a study carried out by Hu et al. [32]. These findings
395 constitute a problem for public health, since potential virulent strains of *Aeromonas* can be
396 transferred to aquatic organisms and human and possibly to cause disease.

397 The high prevalence of *A. caviae* among clinical isolates compared to other species
398 and even to other bacterial genera identified from outbreak; the close relationship
399 visualized in the phylogenetic network, including between clinical and environmental
400 isolates of *A. caviae*; and the high virulence potential observed for this specie, suggest that
401 *A. caviae* may have been responsible for many cases of diarrhea occurred during the
402 outbreak.

403 In conclusion, concatenated sequences of the 16S rRNA and *gyrB* genes has proved to
404 be an efficient tool for taxonomic inference in the genus *Aeromonas* and suggest that two
405 isolates may belong to new species not yet described of this genus. The phylogenetic
406 network revealed an epidemic population structure involving isolates of three *Aeromonas*
407 species, the majority of *A. caviae*. Was detected high virulence potential among the
408 *Aeromonas* species, mainly *A. hydrophila*, *A. aquariorum* and *A. caviae*. The striking
409 features observed for the *A. caviae* isolates suggest that this species played an important
410 role in the diarrhea outbreak occurred in northeast Brazil. The results of this study
411 emphasize the importance of monitoring the species of this bacteria genus in the
412 environment.

Acknowledgments

413

414 The authors thank the Program for Technical Development of Health Inputs-
415 PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities.

416

References

417

- 418 1. Figueras MJ. Clinical relevance of *Aeromonas* sM503. Rev Med Microbil. 2005; 16:
419 145-153.
- 420 2. Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection.
421 Clin Microbiol Rev. 2010; 23: 35-73.
- 422 3. Alperi A, Figueras MJ, Inza I, Martínez-Murcia AJ. Analysis of 16S rRNA gene
423 mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. Int
424 Microbiol. 2008; 11: 185-194.
- 425 4. Marchandin H, Teyssier C, Siméon De Buochberg M, Jean-Pierre H, Carriere C, Jumas-
426 Bilak E. Intra-chromosomal heterogeneity between the four 16S rRNA gene copies in the
427 genus *Veillonella*: implications for phylogeny and taxonomy. Microbiology. 2003; 149:
428 1493-1501.
- 429 5. Roger F, Lamy B, Jumas-Bilak E, Kodjo A, colBVH study group, Marchandin H.
430 Ribosomal multi-operon diversity: an original perspective on the genus *Aeromonas*. PLOS
431 ONE. 2012a; 7: e46268.
- 432 6. Morandi A, Zhaxybayeva O, Gogarten JP, Graf J. Evolutionary and diagnostic
433 implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. J
434 Bacteriol. 2005; 187: 6561-6564.

- 435 7. Yáñez MA, Catalán V, Apráiz D, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Phylogenetic
436 analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int J Syst*
437 *Evol Microbiol*. 2003; 53: 875-883.
- 438 8. Vos M, Quince C, Pijl AS, de Hollander M, Kowalchuk GA. A comparison of *rpoB* and
439 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. *PLOS ONE*. 2012;
440 7: e30600.
- 441 9. Barros MP, França CT, Lins RH, Santos MD, Silva EJ, Oliveira MB, et al. Dynamics of
442 CRISPR loci in microevolutionary Process of *Yersinia pestis* strains. *PLOS ONE*. 2014; 9:
443 e108353.
- 444 10. Joseph SW, Carnahan AM. Update on the genus *Aeromonas*. *ASM News*. 2000; 66:
445 218-223.
- 446 11. von Graevenitz A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. *Infection*. 2007; 35:
447 59-64.
- 448 12. Wong CY, Heuzenroeder MW, Flower RL. Inactivation of two haemolytic toxin genes
449 in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiology*.
450 2007; 144: 291-298.
- 451 13. Heuzenroeder MW, Wong CY, Flower RL. Distribution of two hemolytic toxin genes
452 in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a
453 suckling mouse model. *FEMS Microbiol Lett*. 1999; 174: 131-136.
- 454 14. Sha J, Kozlova EV, Chopra AK. Role of various enterotoxins in *Aeromonas*
455 *hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and
456 evaluation of their enterotoxic activity. *Infect Immun*. 2002; 70: 1924-1935.
- 457 15. Puthucheary SD, Pua SM, Chua KH. Molecular characterization of clinical isolates of
458 *Aeromonas* species from Malaysia. *PLOS ONE*. 2012; 7: e30205.

- 459 16. Senderovich Y, Ken-Dror S, Vainblat I, Blau D, Izhaki I, Halpern M. A molecular
460 study on the prevalence and virulence potential of *Aeromonas* spp. recovered from patients
461 suffering from diarrhea in Israel. PLOS ONE. 2012; 7: e30070.
- 462 17. Hofer E, Reis CMF, Theophilo GND, Cavalcanti VO, Lima NV, Henriques MFCM.
463 Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarreica aguda em São Bento do Una,
464 Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39: 217-220.
- 465 18. Mendes-Marques CL, Nascimento LM, Theophilo GN, Hofer E, Melo Neto OP, Leal
466 NC. Molecular characterization of *Aeromonas* spp. and *Vibrio cholerae* O1 isolated during
467 a diarrhea outbreak. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2012; 54: 299-304.
- 468 19. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Sideman J, Smith J, et al. Current
469 Protocol in Molecular Biology. 1987.
- 470 20. Leal NC, Sobreira M, Leal-Balbino TC, de Almeida AM, de Silva MJ, Mello DM, et
471 al. Evaluation of a RAPD-based typing scheme in a molecular epidemiology study of
472 *Vibrio cholerae* O1, Brazil. J Appl Microbiol. 2004; 96:447-454.
- 473 21. Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Identification of *Aeromonas*
474 Clinical Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 16S
475 rRNA Genes. J Clin Microbiol. 1997; 35: 1671-1674.
- 476 22. Staden R, Beal KF, Bonfield JK. The Staden package, 1998. Methods Mol Biol. 2000;
477 132: 115-130.
- 478 23. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high
479 throughput. Nucleic Acids Res. 2004; 32: 1792-1797.
- 480 24. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions
481 through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol. 1980; 16: 111-120.
- 482 25. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing
483 phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987; 4: 406-425.

- 484 26. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular
485 evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and
486 maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011; 28: 2731-2739.
- 487 27. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns
488 of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus
489 sequence typing data. *J Bacteriol.* 2004; 186: 1518-1530.
- 490 28. Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM, Feil EJ. Displaying the relatedness
491 among isolates of bacterial species -- the eBURST approach. *FEMS Microbiol Lett.*
492 2004; 241: 129-134.
- 493 29. Zamborsky DJ, Nishiguchi MK. Phylogeographical patterns among Mediterranean
494 sepiolid squids and their *Vibrio symbionts*: environment drives specificity among
495 sympatric species. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77: 642-649.
- 496 30. Martínez O, Rodríguez-Calleja JM, Santos JA, Otero A, García-López ML.
497 Foodborne and indicator bacteria in farmed molluscan shellfish before and after
498 depuration. *J Food Prot.* 2009; 72: 1443-1449.
- 499 31. Pablos M, Remacha MA, Rodríguez-Calleja JM, Santos JA, Otero A, García-López
500 ML. Identity, virulence genes, and clonal relatedness of *Aeromonas* isolates from patients
501 with diarrhea and drinking water. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29: 1163-1172.
- 502 32. Hu M, Wang N, Pan ZH, Lu CP, Liu YJ. Identity and virulence properties of
503 *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China.
504 *Lett Appl Microbiol.* 2012; 55: 224-233.
- 505 33. Martínez-Murcia AJ, Saavedra MJ, Mota VR, Maier T, Stackebrandt E, Cousin S.
506 *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *Int J Syst Evol*
507 *Microbiol.* 2008; 58: 1169-1175.

- 508 34. Aravena-Román M, Harnett GB, Riley TV, Inglis TJ, Chang BJ. *Aeromonas*
509 *aquariorum* is widely distributed in clinical and environmental specimens and can be
510 misidentified as *Aeromonas hydrophila*. J Clin Microbiol. 2011; 49: 3006-3008.
- 511 35. Wejdan RTA, Abeer FA, Oruba KHA, Noor SN. PCR Detection of Putative
512 Hemolysin and Aerolysin Genes in An *Aeromonas hydrophila* Isolates from Diarrhea in
513 Babylon Province. Journal of Natural Sciences Research. 2014; 4:41-47.
- 514 36. Roger F, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Kodjo A; colBVH study group, Lamy B.
515 Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution. BMC Microbiol. 2012b; 12: 62-
516 85.
- 517 37. Figueras MJ, Soler L, Chacón MR, Guarro J, Martínez-Murcia AJ. Extended method
518 for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. Int J Syst Evol
519 Microbiol. 2000; 6: 2069-2073.
- 520 38. Galindo CL, Gutierrez C J, Chopra AK. Potential involvement of galectin-3 and
521 SNAP23 in *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin-induced host cell apoptosis.
522 Microb Pathog. 2006; 40: 56-68.
- 523 39. Sha J, Erova TE, Alyea RA, Wang S, Olano JP, Pancholi V, et al. Surface-expressed
524 enolase contributes to the pathogenesis of clinical isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*.
525 J Bacteriol. 2009; 191: 3095-3107.
- 526 40. Wang G, Clark CG, Liu C, Pucknell C, Munro CK, Kruk TM, et al. Detection and
527 characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*
528 by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2003; 41: 1048-1054.
- 529 41. Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez C, Zúñiga G, Figueras MJ, Garduño
530 RA, Castro-Escarpulli G. Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*,
531 *Aeromonas veronii*, and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain:
532 a comparative study. Can J Microbiol. 2007; 53: 877-887.

533 42. Albert MJ, Ansaruzzaman M, Talukder KA, Chopra AK, Kuhn I, Rahman M, et al.
534 Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea,
535 healthy controls, and the environment. J Clin Microbiol. 2000; 38: 3785-3790.

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

Fig. 1

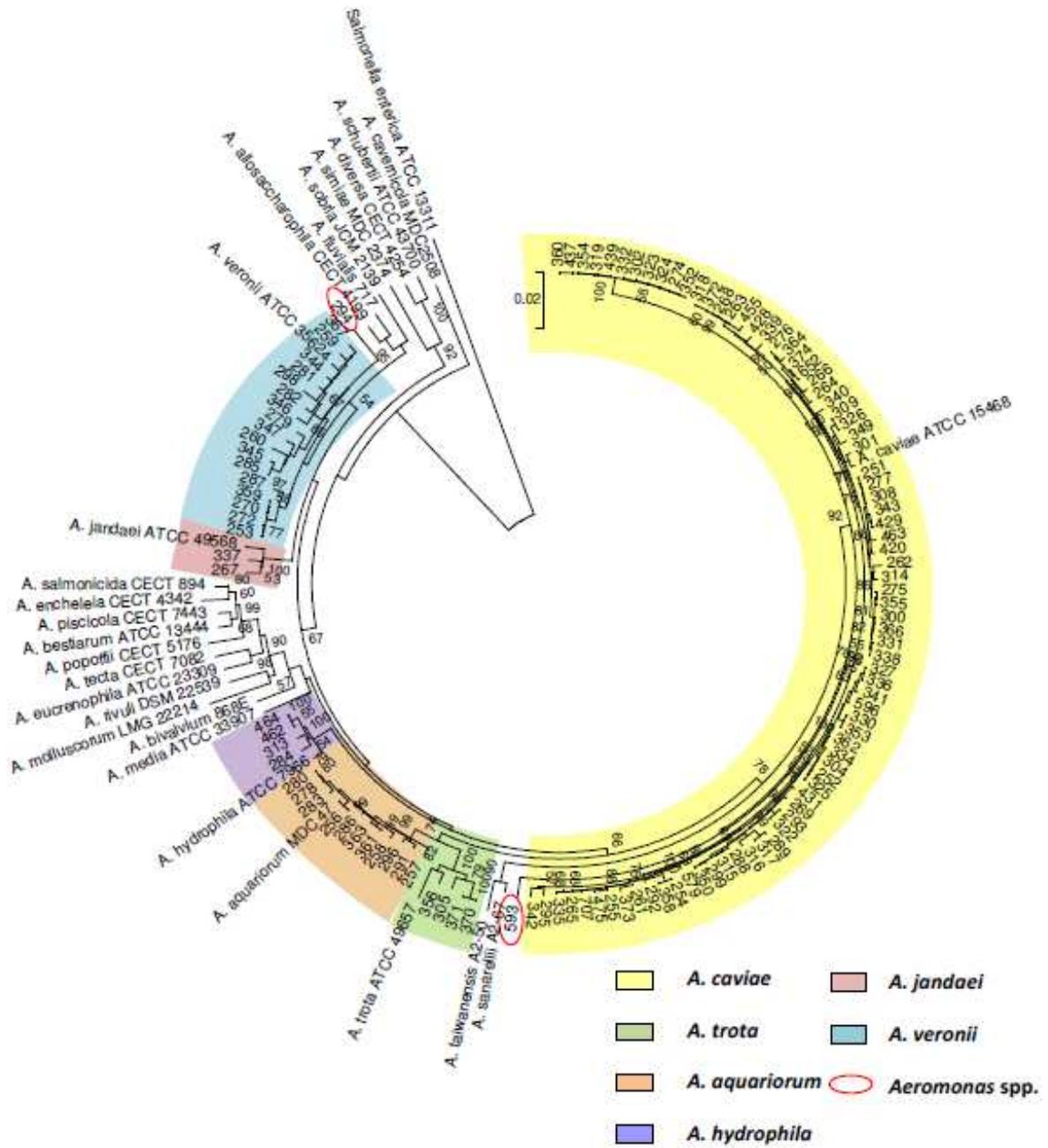
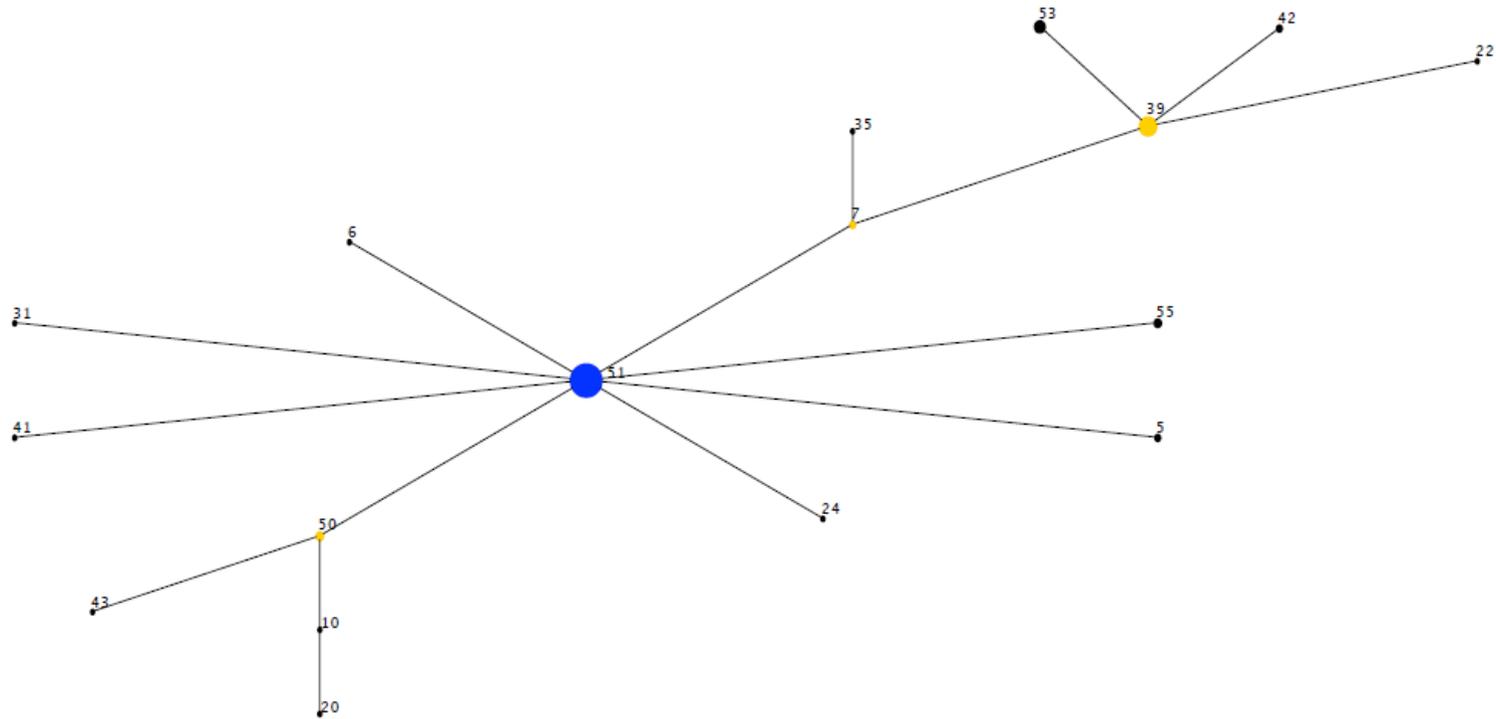


Fig. 2



S1 Table: Accession numbers of the 16S rRNA e *gyrB* sequences of type strains of *Aeromonas*.

Type strains	16S rRNA accession numbers	<i>gyrB</i> accession numbers
<i>A. molluscorum</i> LMG 22214	AY987772.1	AY987538.1
<i>A. tecta</i> CECT 7082	HQ832416.1	HQ442662.1
<i>A. media</i> ATCC 33907	X74679.1	AF417627._1
<i>A. eucrenophila</i> ATCC 23309	X74675.1	AF417629.1
<i>A. encheleia</i> CECT 4342	HQ832414.1	Ay101799.1
<i>A. popoffii</i> CECT 5176	HQ832415.1	AY101801.1
<i>A. bestiarum</i> ATCC 13444	AY987755.1	AY987521.1
<i>A. piscicola</i> CECT 7443	HQ832417.1	HQ442690.1
<i>A. schubertii</i> ATCC 43700	X60416.2	AF417628._1
<i>A. simiae</i> MDC 2374	GQ860944.1	GQ860942.1
<i>A. jandaei</i> ATCC 49568	X60413.2	AF242651.3
<i>A. trota</i> ATCC 49657	X60415.2	AF417633.1
<i>A. salmonicida</i> CECT 894	Ay987751.1	JN711820.1
<i>A. allosaccharophila</i> CECT 4199	S39232.2	HQ442733.1
<i>A. aquariorum</i> MDC 47	EU085557.2	EU268444.1
<i>A. diversa</i> CECT 4254	GQ365710.1	HQ442756.1
<i>A. rivuli</i> DSM 22539	FJ976900.1	FJ969434.1
<i>A. bivalvium</i> 868E	NR_043885.1	EF465525.1
<i>A. fluvialis</i> 717	FJ230078.2	FJ603455.1
<i>A. sobria</i> JCM 2139	AB472942.1	AB473084.1
<i>A. sanarellii</i> A2-67	FJ230076.1	FJ807277.1
<i>A. taiwanensis</i> A2-50	FJ230077.1	FJ807272.1
<i>A. cavernicola</i> MDC 2508	HQ436040.1	HQ442702.1
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311	NR_119108.1	EU014643.1

Available in the GenBank/NCBI database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

S2 Table: Distribution of 59 genotypes among 119 isolates and 26 type strains of *Aeromonas* species by eBURST.

Genotype	Isolates and type strains of <i>Aeromonas</i> spp.
1	260, 282, <i>A. veronii</i> ATCC 35624
2	<i>A. schubertii</i> ATCC 43700
3	279
4	<i>A. salmonicida</i> CECT 894
5	299, 350
6	277
7	255, 475
8	<i>A. sobria</i> JCM 2139
9	284, 313, <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966
10	278
11	<i>A. bestiarum</i> ATCC 13444, <i>A. piscicola</i> CECT 7443
12	253
13	<i>A. rivuli</i> DSM 22539
14	335
15	<i>A. fluvialis</i> 717
16	<i>A. simiae</i> MDC 2374
17	<i>A. bivalvium</i> 868E
18	349
19	305
20	280
21	289
22	340
23	316
24	431
25	370, 371
26	294
27	267, <i>A. jandaei</i> ATCC 49568
28	455
29	<i>A. eucrenophila</i> ATCC 23309
30	270, 272, 287
31	579
32	346
33	317
34	341
35	373
36	359
37	<i>A. allosaccharophila</i> CECT 4199
38	<i>A. molluscorum</i> LMG 22214
39	262, 264, 266, 276, 292, 293, 308, 314, 327, 331, 334, 336, 338, 339, 364
40	285
41	322
42	356, <i>A. trota</i> ATCC 49657
43	291
44	<i>A. media</i> ATCC 33907
45	462, 464
46	259, 281, 298, 344, 345, 347, 367
47	337
48	<i>A. encheleia</i> CECT 4342
49	<i>A. diversa</i> CECT 4254
50	257, 286, 296
51	251, 254, 261, 263, 265, 268, 269, 274, 275, 288, 295, 300, 301, 302, 304, 309, 315, 318, 319, 323, 324, 326, 330, 332, 342, 352, 353, 354, 355, 358, 360, 362, 366, 372, 374, 420, 428, 429, 437, 439, 463, 596, 652, 707, <i>A. caviae</i> ATCC 15468
52	<i>A. tecta</i> CECT 7082
53	256, 258, 283, 361, 363, <i>A. aquariorum</i> MDC 47
54	<i>A. popoffii</i> CECT 5176
55	252 325 343
56	<i>A. sanarellii</i> A2-67
57	593
58	<i>A. taiwanensis</i> A2-50
59	<i>A. cavernicola</i> MDC 2508

10. Currículo Lattes

Lívia Christina Alves da Silva

Curriculum Vitae

Formação acadêmica/titulação

- 2011** Doutorado em Genética e Biologia Molecular.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Caracterização molecular de isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* spp. obtidos no estado de Pernambuco
Orientador: Tereza Cristina Leal Balbino
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2009 - 2010** Mestrado em Saúde Pública.
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, CPQAM, Brasil
Título: Avaliação da reprodutibilidade das reações e da estabilidade dos kits Nested-PCR em tubo único e Multiplex-PCR para aplicação no diagnóstico de peste., Ano de obtenção: 2010
Orientador: Nilma Cintra Leal
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2004 - 2008** Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Formação complementar

- 2012 - 2012** III Curso de Bioinformática.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2012 - 2012** XII Curso Internacional de Epidemiologia Molecular.
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, CPQGM, Brasil
- 2008 - 2008** Epidemiologia e Controle de Infecções.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2008 - 2008** IV Curso de Biologia Molecular.
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil
- 2008 - 2008** Avaliação da Resistência Microbiana.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2008 - 2008** V Curso de Sensibilização em Biossegurança.
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, CPQAM, Brasil
- 2008 - 2008** Pre-Intermediate English.
Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial (PE), SENAC, Brasil
- 2007 - 2007** Beginner's English.
Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial (PE), SENAC, Brasil
- 2007 - 2007** Elementary English.
Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial (PE), SENAC, Brasil

2006 - 2006 Epidemiologia e Controle de Infecções.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Colégio de Aplicação do Recife/UFPE - CAP/UFPE

Vínculo institucional

2011 - 2011 Vínculo: Contrato, Enquadramento funcional: Professor de Ciências, Regime: Parcial

2. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2013 - 2013 Vínculo: Estágio de Docência , Enquadramento funcional: Estágio de Docência, Regime: Parcial

2008 - 2008 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Estagiária, Regime: Parcial

2008 - 2008 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Monitoria, Regime: Parcial

3. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ - CPQAM/FIOCRUZ

Vínculo institucional

2008 - 2009 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Regime: Parcial

4. Instituto de Endocrinologia e Medicina Nuclear do Recife - Cerpe

Vínculo institucional

2005 - 2007 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Estágio, Regime: Parcial

Áreas de atuação

1. Microbiologia
2. BIOLOGIA MOLECULAR
3. diagnóstico molecular de microrganismos

Prêmios e títulos

2013 1º lugar pela melhor apresentação oral na III Jornada de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco.

2009 Láurea Universitária, por ter apresentado melhor desempenho acadêmico no Curso de Graduação em Ciências Biológicas/Licenciatura, com média global de 9,0. Universidade Federal de Pernambuco

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **SILVA, L. C. A.**, VASCONCELOS, S. S., MENDES-MARQUES, C. L., ALMEIDA, A.M.P., LEAL, N.C. Plague Diagnosis STNPCR and MPCR Kits Assembly, Reaction Reproducibility, and Reagent. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* , v.954, p.143 - 147, 2012.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **SILVA, L. C. A.**, LEAL, N.C., LEAL-BALBINO, T. C. Caracterização molecular de cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de casos clínicos no estado de Pernambuco In: II Jornada de pós-graduação em genética da UFPE, 2012, Recife.

2. **SILVA, L. C. A.**, LEAL, N.C., LEAL-BALBINO, T. C. Caracterização molecular de cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de casos clínicos no estado de Pernambuco In: I Jornada de pós-graduação em genética da UFPE, 2011, Recife

3. VASCONCELOS, S.S., **SILVA, L. C. A.**, ALMEIDA, A.M.P. Detecção da *Yersinia pestis* nos focos de peste do Brasil por imunofluorescência direta e PCR In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2010, Foz do Iguaçu.

4. OLIVEIRA, G.M., **SILVA, L. C. A.**, VASCONCELOS, S.S., MARTINS, I., ALMEIDA, A.M.P. Marco legal e competências do Serviço de Referência em Peste do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2010, Foz do Iguaçu.

5. **SILVA, L. C. A.**, CHIORATTO, G. T. S., ALMEIDA, A.M.P., LEAL, N.C. New tools for diagnosis in the activities of the Brazilian Plague Program In: 10th International Symposium on Yersinia, 2010, Recife.

6. CAVALCANTI, M.E., SOBRINHO, J.D., MELO, K.M.G., **SILVA, L. C. A.**, VASCONCELOS, S.S., ARAUJO, C.E., MARTINS, I., ALMEIDA, A.M.P., TAVARES, C., OLIVEIRA, G.M. A Relevância do Serviço de Referência em peste do CPqAM In: In: 45° Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009, Recife.

7. **SILVA, L. C. A.**, LEAL, N.C., ALMEIDA, A. M. P. Avaliação da estabilidade de um kit Nested-PCR em tubo único para aplicação no diagnóstico de peste In: XVI Reunião Anual de Iniciação Científica, 2008, Rio de Janeiro.

8. **SILVA, L. C. A.**, LEAL, N.C., ALMEIDA, A. M. P. Avaliação da estabilidade de um kit Nested-PCR em tubo único para aplicação no diagnóstico de peste In: XII Jornada de Iniciação Científica, 2008, Recife.

Apresentação de trabalho

1. **SILVA, L. C. A.**, LEAL-BALBINO, T. C., LEAL, N.C. Caracterização molecular de isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* spp. obtidos no estado de Pernambuco, In: III Jornada de pós-graduação em genética da UFPE, 2013, Recife. (Apresentação oral de Trabalho)

2. **SILVA, L. C. A.**, Silvana Santos Vasconcelos, LEAL, N.C., ALMEIDA, A. M. P. Kits Nested-PCR em tubo único e Multiplex-PCR para diagnóstico da peste: construção, estabilidade dos kits, e reprodutibilidade das reações. In: XII Congresso Brasileiro de Biomedicina, 2010, Recife. (Apresentação oral de Trabalho)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **SILVA, L. C. A. Métodos moleculares de diagnóstico e tipagem de bactérias**, 2010. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)

Eventos

Participação em eventos

1. **GE Day / Microarray**, 2013.
2. **XII Congresso Brasileiro de Biomedicina**, 2010.
3. **I Workshop Interno do Núcleo de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz Pernambuco**, 2010.
4. **10th International Symposium on Yersinia**, 2010.
5. **1st International Workshop on Biotechnology**, 2008.
6. **III Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana**, 2008.
7. **II Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana**, 2006.

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. LEAL, N.C., **SILVA, L. C. A.**, MENDES-MARQUES, C. L. Participação em banca de Katharina Marques Diniz. **Avaliação da técnica Loop mediated isothermal amplification (LAMP) no diagnóstico da peste**. 2014 (Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

2. LEAL, N.C., MENDES-MARQUES, C. L., RIBEIRO, K. X. F., **SILVA, L. C. A.** Participação em banca de NATÁLIA REGINA SOUZA DA SILVA. **Avaliação do potencial de virulência de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de casos clínicos e alimentos no Brasil**. 2012 (Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

Participação em banca de comissões julgadoras

1. **Ciência Recife 2011**, 2011
Universidade Federal de Pernambuco