



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Naedja Carla dos Santos Leite da Silva

**Gene *floR* e a resistência ao florfenicol em isolados de
Aeromonas spp. autóctones de organismos aquáticos**

Petrolina – PE
2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Naedja Carla dos Santos Leite da Silva

**Gene *flor* e a resistência ao florfenicol em isolados de
Aeromonas spp. Autóctones de organismos aquáticos**

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus de Ciências Agrárias, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Gisele Veneroni Gouveia
Co-Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da costa

Petrolina – PE
2016

S586g Silva, Naedja Carla dos Santos Leite da Silva
Gene *floR* e a resistência ao florfenicol em isolados de
Aeromonas spp. autóctones de organismos aquáticos / Naedja Carla
dos Santos Leite da Silva. -- Petrolina, 2016.
68 f.: il. ; 29cm.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade
Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias,
Petrolina - PE, 2016.

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Veneroni Gouveia

Referência.

1. Gene *floR*. 2. Polimorfismos. 3. Estrutura e Função proteica.
4. Resistência antimicrobiana. I. Título. II. Universidade Federal do
Vale do São Francisco.

CDD 589.9

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Folha de Aprovação

Naedja Carla dos Santos Leite da Silva

**Gene *floR* e a resistência ao florfenicol em isolados de
Aeromonas spp. autóctones de organismos aquáticos**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Profa. Dra. Francesca Silva Dias Nobre
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Profa. Dra. Ana Carolina Landim Pacheco
Universidade Federal do Piauí

Petrolina – PE
2016

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus pela sua bondade comigo e pelas bênçãos diárias.

Ao meu Pai e principalmente a minha Mãe que é meu sustento nas horas que mais preciso que me educa e me dá forças para que eu continue atrás dos meus sonhos todos os dias.

A minha grande amiga Jackeline que está ao meu lado sempre que eu precisar.

Ao meu namorado pela paciência comigo nessa fase tão importante da minha vida profissional.

A Renata Peixoto que fez a graduação comigo e que me incentivou a entrar no laboratório de Microbiologia em 2009. Área que carrego com muita paixão.

Ao Professor Mateus Matiuzzi que me recebeu com muito carinho em seu laboratório, que acreditou em mim e por muitos conselhos que me deu durante todos esses anos. Tenho profunda admiração.

A Gisele Veneroni que aceitou ser minha orientadora no mestrado, por toda sabedoria e aprendizado passado a mim nesses dois anos. Digo que aprendi muito.

Ao Professor João Gouveia por me orientar também. Pela paciência e aprendizado. Tenha certeza que me ajudou bastante.

A Joel que também deu muito do seu tempo para me ajudar, e Danillo por todas as vezes que pedi ajuda esteve de prontidão para me ajudar. Sou muito grata.

A Professora Jane pela ajuda e todos os ensinamentos. Uma pessoa encantadora.

Aos meus queridinhos do laboratório! Por todos aqueles que passaram nessa minha grande temporada no laboratório. Conheci muita gente especial e que vou levar para o resto da vida. Cada pessoa eu carrego uma lembrança especial. O laboratório de Microbiologia da Univasf foi uma escola pra mim. Somos mesmo uma grande família. E Mateus Matiuzzi um Pai.

Só tenho a agradecer mesmo!

RESUMO

O gene *floR* descrito é relacionado na literatura como responsável pela resistência ao florfenicol, que é um antimicrobiano amplamente utilizado na aquicultura. Esse gene já foi relatado em muitas espécies de bactérias, inclusive no gênero *Aeromonas*. Essas bactérias causam alta mortalidade na piscicultura trazendo prejuízos econômicos. É importante que haja estudos sobre esse gene e possíveis mutações que possam levar a alterações na estrutura e função da proteína. O objetivo desse estudo foi caracterizar o gene *floR* em isolados de *Aeromonas* spp. e verificar se a presença desse gene está associada com a resistência ao florfenicol em *Aeromonas* spp. obtidas do Vale do São Francisco. Foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) do gene rRNA 16S para identificação de gênero dos isolados. PCRs também foram realizadas para verificar a presença do gene *floR*. Amostras positivas para a presença do gene foram sequenciadas e analisadas quanto a presença de polimorfismos por meio de alinhamentos. Os diferentes haplótipos detectados foram utilizados para análises com os programas SIFT e PolyPhen para predição de alteração de função proteica. A modelagem estrutural da proteína codificada pelo gene *floR* foi realizada com o programa Modeller e, os modelos foram avaliados pelo Procheck, Verify3D e Whatif. A similaridade das estruturas tridimensionais da proteína referência foi comparada com as estruturas tridimensionais das proteínas codificadas pelos diferentes haplótipos através do TM-align. A resistência das bactérias ao florfenicol foi avaliada através do teste de microdiluição em caldo, o qual também foi realizado na presença do carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona para verificar o efeito da inibição da bomba de efluxo sobre tal resistência. Dentre os 45 isolados avaliados, 27 foram confirmados como pertencentes ao gênero *Aeromonas* e foram verificadas quanto a presença do gene *floR*. Dez isolados positivos para o gene foram sequenciados, o que permitiu identificação de 3 polimorfismos no gene *floR*, que levaram a construção de 3 haplótipos diferentes (TAA, TTA e CTG). As análises realizadas com os programas SIFT e PolyPhen apontaram que os haplótipos TTA e TAA provavelmente poderiam alterar a estrutura-função da proteína. As proteínas modeladas para os três haplótipos demonstraram possuir praticamente a mesma conformação estrutural entre si. Todos os isolados que apresentaram o gene foram resistentes ao florfenicol e aqueles que não apresentavam foram sensíveis. O teste na presença do Carbonil Cianeto m-Clorofenil Hidrazona foi realizado para 3 isolados, cada isolado representando um haplótipo, sendo possível observar a inibição do crescimento bacteriano em todas as concentrações independente do haplótipo. Os resultados obtidos nesse estudo mostram que a resistência ao florfenicol em *Aeromonas* spp. pode ser explicada pela presença do gene *floR*, e que esse gene está relacionado com uma bomba de efluxo. As mutações verificadas no gene *floR*, parecem não estar envolvidas com alteração de estrutura e função da proteína codificada por esse gene.

Palavras chave: Gene *floR*. Polimorfismos. Estrutura e Função proteica. Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

The *floR* gene is described in related literature as responsible for resistance to florfenicol, which is a widely used antimicrobial agent in aquaculture. This gene has been reported in many species of bacteria, including the genus *Aeromonas*. These bacteria cause high mortality in fish farming bringing economic losses. It is important that studies of this gene and possible mutations that can lead to changes in the structure and function of the protein. The aim of this study was to characterize the flower gene in isolates of *Aeromonas* spp. and check the presence of this gene is associated with resistance to florfenicol in *Aeromonas* spp. obtained from the San Francisco Valley. The polymerase chain reaction were performed (PCR) for the 16S rRNA gene for genus identification of isolates. PCRs were also performed to verify the presence of the *floR* gene. Positive samples for the presence of the gene were sequenced and analyzed for the presence of polymorphisms using alignments. Different haplotypes detected were used for analysis with the SIFT and PolyPhen programs for prediction of changes in protein function. The structural modeling of protein encoded by the *floR* gene was performed using the program Modeller, and the models were evaluated by Procheck, Verify3D and Whatif. The similarity of the three-dimensional structures of the reference protein were compared with the three-dimensional structures of the proteins encoded by the different haplotypes by TM-align. Bacterial resistance to florfenicol was assessed by the microdilution test, which was also performed in the presence of carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine to verify the effect of inhibiting the efflux pump of such resistance. Among the 45 isolates evaluated, 27 were confirmed as belonging to the genus *Aeromonas*, and were checked for the presence of the *floR* gene. Ten isolates were positive for the gene sequenced, which allowed the identification of polymorphisms in 3 *floR* gene, which led to the construction of three different haplotypes (TAA TTA and CTG). The analyzes carried out with the SIFT and PolyPhen programs showed that the TTA and TAA haplotypes could probably change the protein structure-function. Proteins modeled for the three haplotypes were found to have substantially the same structural conformation with each other. All isolates presenting the gene were resistant to florfenicol and those who did not have were sensitive. The test in the presence of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine was conducted for 3 isolates, representing each single haplotype and was observed inhibition of bacterial growth at all concentrations independent of the haplotype. The results of this study show that resistance in flofenicol *Aeromonas* spp. May be explained by the presence of *floR* gene and that this gene is associated with an efflux pump. Mutations observed in *floR* gene do not appear to be involved with altered structure and function of the protein encoded by that gene.

Keywords: Gene *floR*. Polymorphisms. Protein structure and function. Antimicrobial resistance

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Resultado apresentado pelo PolyPhen para o SNP_721 que ocasiona uma alteração de uma glicina (G) para uma serina (S) na posição 241 da cadeia polipeptídica.....45
- Figura 2. Resultado apresentado pelo PolyPhen para o SNP_479 ocasiona uma alteração de valina (V) para alanina (A) na posição 160 da cadeia polipeptídica.....45
- Figura 3. Resultado apresentado pelo PolyPhen para o SNP_683 que ocasiona uma alteração de tirosina (Y) para fenilalanina (F) na posição 228 da cadeia polipeptídica.....45
- Figura 4. Gráfico de Ramachandran referente a proteína alvo com 92,2% dos resíduos da proteína modelada em regiões favoráveis (A, B e L), 6,4% em regiões permitidas (a, b, l, p), 1,4% em regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p), 0,0% em regiões desfavoráveis (branco).....48
- Figura 5. Gráfico mostrando a pontuação dos resíduos da proteína modelada referente a proteína alvo.....48
- Figura 6. Figura 6. Proteína modelada no programa Modeller para A. Bestiarum (A), haplótipo TAA (B), TTA (C) e CTG (D). Estrutura 3D, átomos e ribons, respectivamente.....49
- Figura 7. Gráfico de Ramachandran referente ao haplótipo TAA com 92,2% dos resíduos da proteína modelada em regiões favoráveis (A, B e L), 6,3% em regiões permitidas (a, b, l, p), 0,6% em regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p), 0,9% em regiões desfavoráveis (branco).....50
- Figura 8. Gráfico de Ramachandran referente ao haplótipo TTA com 91,4% dos resíduos da proteína modelada em regiões favoráveis (A, B e L), 6,9% em regiões permitidas (a, b, l, p), 1,2% em regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p), 0,6% em regiões desfavoráveis (branco).....50
- Figura 9. Gráfico de Ramachandran referente ao haplótipo CTG com 92,2% dos resíduos da proteína modelada em regiões favoráveis (A, B e L), 6,4% em regiões permitidas (a, b, l, p), 1,4% em regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p), 0,0% em regiões desfavoráveis (branco).....51
- Figura 10. Gráfico mostrando a pontuação dos resíduos da proteína modelada referente ao haplótipo TAA.....52
- Figura 11. Gráfico mostrando a pontuação dos resíduos da proteína modelada referente ao haplótipo TTA.....52

Figura 12. Gráfico mostrando a pontuação dos resíduos da proteína modelada referente ao haplótipo CTG.....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Polimorfismos identificados nos isolados de <i>Aeromonas</i> spp.....	43
Tabela 2. Alterações de aminoácidos na cadeia polipeptídica segundo os polimorfismos detectados.....	43
Tabela 3. Resultados referentes ao algoritmo SIFT na predição de alteração de função da proteína codificada pelo gene <i>floR</i>	44
Tabela 4. Moldes selecionados com a estrutura tridimensional da proteína resolvida.....	46
Tabela 5. Modelos gerados pelo Modeller e o score atribuído para a modelagem da proteína codificada pelo gene <i>floR</i> em <i>A. Bestiarium</i> (gene referência).....	47
Tabela 6. Modelos gerados pelo Modeller e o score atribuído para a modelagem da proteína codificada pelo gene <i>floR</i> de cada haplótipo.....	47
Tabela 7. Referente aos 3 haplótipos testados na microdiluição em caldo com presença e ausência do inibidor CCCP.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST- Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta de alinhamento local básico)

CBM- Concentração Bactericida Mínima

CCCP- Carbonil Cianeto m-Clorofenil Hidrazona

CMLA-like- gene de resistência ao cloranfenicol e florfenicol

DNA- Ácido desoxirribonucleico

dNTP- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

FAO- Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FFC- Florfenicol

Flo- gene de resistência ao cloranfenicol e florfenicol

floR- gene de resistência ao florfenicol

FloST- gene de resistência ao cloranfenicol e florfenicol

MFS- Superfamília dos Facilitadores Majoritários

MgCl₂-Cloroeto de Magnésio

MPA- Ministério da Pecuária e Abastecimento

NCBI- Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

PCR- Reação em Cadeia em da Polimerase

PDB- Protein Data Bank (Banco de dados de proteínas)

pp-flo- gene de resistência ao cloranfenicol e florfenicol

PSIC- Position-Specific Independent Counts (Contagem independente de posição específica)

rDNA- DNA ribossomal

rRNA- RNA ribossomal

SIFT- Sorting intolerant from tolerant (Classificando intolerante a partir tolerante)

SNP- Polimorfismo de Nucleotideo Único

TSA- Agar Soja Trypticaseína

UFC- Unidade Formadora de Colônia

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Piscicultura.....	17
2.1.1. Produção mundial de pescado.....	17
2.1.2. Doenças bacterianas na piscicultura.....	18
2.2. Gênero <i>Aeromonas</i>	20
2.2.1. História e classificação do gênero <i>Aeromonas</i>	20
2.2.2. Características do gênero <i>Aeromonas</i>	23
2.3. Uso de antimicrobianos na piscicultura.....	25
2.4. Uso do florfenicol na piscicultura.....	26
2.5. Resistência de <i>Aeromonas</i> spp. aos antimicrobianos.....	28
2.5.1. Resistência ao florfenicol mediada pelo gene <i>floR</i>	29
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivos Gerais.....	31
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Origem das amostras.....	32
4.2. Extração de DNA genômico.....	32
4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para os genes rRNA16S e <i>floR</i>	33
4.4. Purificação do DNA para sequenciamento.....	34
4.5. Sequenciamento dos produtos amplificados dos genes rRNA 16S e <i>floR</i> e análise dos eletroferogramas.....	35
4.6. Identificação dos isolados.....	35
4.7. Identificação de polimorfismos no gene <i>floR</i>	35

4.8. Predição de alteração de função da proteína codificada pelo gene <i>floR</i> em função da presença de polimorfismos no gene.....	36
4.9. Modelagem da proteína codificada pelo gene <i>floR</i>	37
4.10. Análise da resistência dos isolados de <i>Aeromonas</i> spp. ao florfenicol.....	38
4.11. Análise da resistência dos isolados de <i>Aeromonas</i> spp. ao florfenicol na presença do Carbonil Cianeto m-Clorofenil Hidrazona (CCCP).....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÕES.....	56

1. INTRODUÇÃO

De acordo com dados publicados pelo Ministério de Pesca e Aquicultura, o Brasil ocupou o 19º lugar entre os trinta maiores produtores de pescado, contribuindo com 1.264.765 t na produção mundial de pescado em 2010, (MPA, 2011). De acordo com FAO (2012) a produção de peixes em 2010 foi de 148 milhões de toneladas, sendo que 128 milhões de toneladas foram utilizadas como alimento humano. Em 2011 de acordo com Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura (2014), foram produzidas cerca de 170 milhões de toneladas de pescado, sendo 130,8 milhões de toneladas para consumo humano.

As doenças bacterianas são um grande entrave no cultivo de peixes, pois causam grandes perdas econômicas pela alta mortalidade que provocam (BOINJIK; BRANDÃO, 2001). As *Aeromonas* spp. são contaminantes comuns de peixe e marisco e, são onipresentes no ambiente aquático (HANNINEN et al., 1997). Essas bactérias podem ser encontradas em água doce, água potável, mesmo clorada, solo e alimentos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). O vasto panorama de fontes ambientais a partir da qual podem ser encontradas essas espécies, permite que haja uma constante interação entre essas bactérias e os seres humanos (JANDA; ABBOTT, 2010).

Atualmente as *Aeromonas* spp. estão incluídas na família *Aeromonadaceae* (PARKER; SHAW, 2011). Essas bactérias são consideradas patógenos entéricos, causadores de graves problemas para a saúde pública, pois estão ligadas a doenças humanas, tais como: gastroenterite dos tecidos moles, infecções musculares, septicemia e doenças de pele (IGBINOSA et al., 2012). A diarreia é a forma mais comum da manifestação dessas bactérias em humanos (GHENGHESH et al., 2008).

As septicemias causadas pelas bactérias do gênero *Aeromonas* em peixes são bastante frequentes nos cultivos, geralmente acometendo os animais com a resistência comprometida após estresses associados ao manejo ou a problemas de qualidade de água (KUBITZA, 2008). As causas de grandes perdas na piscicultura intensiva são as infecções bacterianas e a ausência de meios

preventivos eficazes contra as doenças, resultando na utilização extensiva de compostos antimicrobianos (HEKTOEN et al., 1995).

A oxitetraciclina foi por muitos anos o agente de primeira escolha na piscicultura (HEKTOEN et al., 1995). O Aquaflor® é o primeiro antimicrobiano comercialmente registrado para uso aquícola. É um produto à base de florfenicol (FFC) (SCHERING plough- aquaflor), e atualmente o FFC é o único permitido para o uso na aquicultura no Brasil (MAPA, 2010 citado por ROSSI, 2012).

O FFC é um antimicrobiano análogo fluorado do cloranfenicol e tianfenicol que foi produzido sinteticamente para uso exclusivo de médicos veterinários (SCHERING plough- technical monograph). É utilizado no tratamento antibacteriano na piscicultura, e devido o seu uso intensivo, os potenciais efeitos nocivos nos organismos aquáticos tornam-se preocupantes (BOTELHO et al., 2015).

Segundo Li et al. (2015), o uso abusivo de antimicrobianos na piscicultura faz com que as bactérias enfrentem forte pressão de seleção, que pode levar a intensificação da resistência através de uma variedade de mecanismos, tais como mutação e transferência horizontal de genes de resistência. O *floR* é um gene relatado em vários estudos como aquele relacionado com a resistência ao antimicrobiano florfenicol (FERNANDEZ-ALARCON et al., 2008). Gordon et al., (2008) fizeram o primeiro relato do gene *floR* em *Aeromonas bestiarum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Piscicultura

2.1.1. Produção mundial de pescado

A pesca de captura e aquicultura mundial contribuiu com cerca de 148 milhões de toneladas de peixes em 2010, dos quais cerca de 128 milhões de toneladas foram utilizados como alimento humano (FAO, 2012). A produção mundial de alimentos para consumo humano a partir de peixes cresceu a uma taxa média anual de 6,2% no período entre 2000 e 2012. Os 15 principais países foram responsáveis por 92,7% de toda a produção de alimentos em 2012, entre eles destacam-se Chile e Egito (FAO, 2014).

O Brasil melhorou de forma significativa sua produção de pescado nos últimos anos (FAO, 2014). Em 2011 as espécies mais cultivadas nacionalmente foram a tilápia e o tambaqui, as quais somadas representaram 67,0% da produção nacional de pescado. Contudo, também merecem destaque a produção de tambacu, carpa e pacu, que juntas representaram 20,1% da produção (MPA, 2011). De acordo com o IBGE a tilápia foi o pescado que teve maior produção em 2014, com 198.664.464 kg (IBGE, 2014).

De acordo com a FAO (2014), uma porção de 150g de peixe pode fornecer cerca de 50-60% da exigência diária de proteína. Em 2010, os peixes foram responsáveis por 16,7% da ingestão global da proteína animal da população e 6,5% de toda a proteína consumida (FAO, 2014).

Segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura, a produção mundial de pescado atingiu aproximadamente 142 milhões de toneladas em 2008, 146 milhões de toneladas em 2009 e 168 milhões de toneladas em 2010, tanto da pesca extrativa quanto da aquicultura. A China, a Indonésia, a Índia e o Peru foram os maiores produtores em 2009, já em 2010 foram a China, a Indonésia, a Índia e o Japão. O Brasil contribuiu com 0,75% (1.264.765 t) da produção mundial de pescado em 2010 (MPA, 2010). De acordo com o Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura (2014), o Brasil ocupou a 17ª posição no ranking mundial na produção de pescados em cativeiro e a 19ª na produção total de pescados.

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor na aquicultura do continente americano, sendo o primeiro o Chile. O setor de pesca e aquicultura desempenham um papel importante na segurança alimentar do Brasil, fornecendo uma fonte importante de proteínas e subsistência para milhões de famílias. Estima-se que cerca de quatro milhões de pessoas estejam direta ou indiretamente envolvidas nesse setor (OCDE –FAO 2015).

Em 2011, a região Nordeste registrou a maior produção de pescado do país, com 454.216,9 t, respondendo por 31,7% da produção nacional. As regiões Sul, Norte, Sudeste e Centro-Oeste registraram 336.451,5 t (23,5%), 326.128,3 t (22,8%), 226.233,2 t (15,8%) e 88.944,5 t (6,2%), respectivamente (MPA, 2011).

Uma série de mercados emergentes tornaram-se importantes principais exportadores do mundo, entre estes o Brasil, o México, a Federação da Rússia e o Egito (FAO, 2014). No ano de 2011, os Estados Unidos foram o principal comprador dos produtos brasileiros de pescado, em volume e em valor, seguido pela Espanha, que surge com saldos comerciais positivos, mantendo a posição à frente do Japão (MPA, 2011).

2.1.2. Doenças bacterianas na piscicultura

As bacterioses apresentam-se como um dos principais obstáculos sanitários e produtivos dentro das criações intensivas de peixes em nível mundial. Em condições favoráveis, essas bactérias encontram-se na água de criação sem causarem nenhum impacto negativo na saúde dos animais. No entanto, quando fatores ambientais, nutricionais, genéticos, sanitários entre outros interferem no ambiente de cultivo, ou nas populações, estas mesmas bactérias podem causar impactos diretos sobre a saúde dos peixes, deixando de assumir um caráter oportunista e provocando doenças (SCHERING plough-aquaflor).

As doenças bacterianas causam grandes perdas econômicas pela alta mortalidade que provocam (BOINJIK; BRANDÃO, 2001). Segundo Kubtiza (2010), os produtores geralmente potencializam o risco de ocorrência de doenças por ignorarem simples práticas de manejo como monitoramento da temperatura da água, que é fator decisivo na ocorrência e severidade de doenças bacterianas.

As septicemias causadas pelas bactérias do gênero *Aeromonas*, *Edwardsiella* e *Vibrio* são bastante frequentes em cultivos intensivos, geralmente acometendo peixes com a resistência comprometida após estresses associados ao manejo ou a problemas de qualidade de água (KUBITZA, 2008), ainda segundo esse autor, *Flavobacterium columnare* e *Streptococcus* spp. são espécies que também acometem essas criações. A bactéria *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* também acometem os peixes, e é o agente causador da furunculose, uma doença de caráter sistêmico (DALLAIRE-DUFRESNE et al., 2014).

Espécies de *Aeromonas* mesófilas, especialmente *A. hydrophila*, têm sido associadas a maior mortandade de peixes em todo o mundo, resultando em enormes perdas econômicas (JANDA; ABBOTT, 2010). É conhecido que o gênero *Aeromonas* causa mortalidade significativa tanto em água doce quanto em água marinha (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013). Importantes doenças bacterianas afetam o cultivo de peixes marinhos como: furunculoses, doença renal bacteriana (BKD), vibrioses, estreptococoses, úlceras de inverno, micobacterioses, pseudomoniases (doença do inverno), pasteureloses, piscirickettsioses, flexibacterioses (TORANZO et al., 2005).

Aeromonas spp. são patógenos importantes de peixes e são uma ameaça persistente para o setor da aquicultura (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013). São reconhecidos como causadores de doenças sistêmicas em animais peçonhentos (JANDA; ABBOTT, 2010). Essas bactérias convivem em equilíbrio com os peixes e as doenças só acometem esses animais devido a um desequilíbrio ambiental ou manejo inadequado (KUBITZA; KUBITZA, 2004). Segundo HU et al. (2012) *A. hydrophila* possui maior patogenicidade para os peixes do que as outras espécies de relevância clínica.

As *Aeromonas* móveis causam diversas condições patológicas que incluem infecções agudas e crônicas, podendo apresentar ulceração dérmica, da cauda ou apodrecimento das barbatanas, ulcerações oculares, eritrodermatite, septicemia hemorrágica, doença da ferida vermelha (red sore disease), podridão vermelha (red rot disease). O abdômen pode ficar distendido e as infecções

crônicas manifestam-se principalmente como formas de doenças ulcerosas, em que as lesões dérmicas com hemorragia e inflamação são aparentes (CIPRIANO, 2001). Ainda segundo esse autor a gravidade da doença é influenciada por inúmeros fatores inter-relacionados, incluindo virulência bacteriana, o tipo e grau de estresse exercido sobre uma população de peixes, o estado fisiológico do hospedeiro, e do grau de resistência genética inerente dentro das populações específicas de peixes.

Com o aumento do consumo de produtos da aquicultura, a possibilidade de contrair infecções zoonóticas pela manipulação ou ingestão destes produtos também aumenta. *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Mycobacterium marinum*, *Streptococcus iniae*, *Vibrio vulnificus* e *V. damsela* são patógenos que têm sido associados a surtos de doenças através do consumo de peixe. Os peixes doentes são mais vinculados a ocasionar infecção em seres humanos (HAENEN et al., 2013).

2.2. Gênero *Aeromonas*

2.2.1. História e classificação do gênero *Aeromonas*

Antigamente o gênero *Aeromonas* era classificado na família *Vibrionaceae* principalmente com base em aspectos fenotípicos (COLWELL et al., 1986). Isolados de *Aeromonas* foram classificados no passado em diversos gêneros, dentre eles como *Aerobacter*, *Pseudomonas* e *Vibrio* (JOSEPH; CARNAHAN, 1994). Colwell et al. (1986), após várias análises moleculares incluindo sequenciamento dos genes rRNA 16S e 5S e, dados de hibridização de rRNA-DNA perceberam que o grupo *Aeromonas* tinha uma história evolutiva diferente das famílias *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae*, justificando a remoção das *Aeromonas* da família *Vibrionaceae* e elevando-as ao nível de família.

Foi proposto então por Colwell et al. (1986) a família *Aeromonadaceae*, já que *Aeromonas* spp. representavam uma família discreta de eubactérias. O gênero *Aeromonas* foi proposto pela primeira vez por Kluver e van Niel em 1936 (JOSEPH; CARNAHAN, 1994).

Em 1980, apenas quatro espécies de *Aeromonas* possuíam nomenclatura definida (*A. hydrophila*, *A. punctata*, *A. salmonicida*, e *A. sobria*) (JANDA; ABBOTT, 2010). Segundo Colwell et al., (1986), um dos principais problemas enfrentados na definição precisa da posição taxonômica de *Aeromonas* spp. é que essas espécies possuem propriedades fenotípicas comuns às famílias *Vibrionaceae* e *Enterobacteriaceae*.

Abbott et al. (1998) afirmaram que a identificação errônea das espécies que compõe o gênero *Aeromonas* é um problema constante, pois as mesmas são frequentemente confundidas como pertencentes ao gênero *Vibrio*. A diversidade fenotípica das espécies de *Aeromonas* dificulta o desenvolvimento de métodos consistentes para sua identificação, tornando-se necessária a utilização de métodos moleculares para tornar a identificação mais precisa (ABBOTT et al., 2003).

Há um crescente número de novas espécies de *Aeromonas* e de cepas já reconhecidas que apresentam reações bioquímicas atípicas ou incomuns, sendo cada vez mais difícil identificá-las como pertencentes ao gênero *Aeromonas* (ABBOTT et al., 2003). Segundo Graf (1999) e Carnahan et al. (1991) *A. trola* apresenta sensibilidade a ampicilina diferindo-se de outras espécies do gênero. Abbott et al. (2003) afirmaram que um único isolado de *A. caviae* em teste bioquímico apresentou-se como oxidase negativa.

Vários métodos moleculares podem ser usados com o objetivo de se identificar bactérias do gênero *Aeromonas*, já que há várias limitações nos outros métodos utilizados, como testes bioquímicos e fenotípicos (JOSEPH; CARNAHAN, 1994). Os testes bioquímicos ainda se fazem úteis no auxílio da identificação desse gênero, mas que seja realizado juntamente com métodos moleculares (GRAF, 1999). A Identificação de *Aeromonas* ao nível de espécie pode ser muito desafiadora, pela dificuldade em separar as espécies com características muito próximas utilizando-se testes bioquímicos convencionais. As espécies *A. veronii* bv. *sobria* e *A. hydrophila* possuem características muito semelhantes e são de difícil distinção (JANDA; ABBOTT, 2010).

De acordo com Yousr et al. (2007), métodos moleculares como a PCR podem constituir importantes ferramentas que permitem classificar de forma mais precisa espécies de *Aeromonas*. Porém, a distinção entre espécies irá depender da região do genoma a ser avaliada. Pois, para distinção de espécies é necessário avaliar um gene que seja conservado para o gênero, mas que possua variabilidade suficiente para distinguir espécies.

Um estudo a partir do rDNA 16S se torna limitado quando seu uso é para separar espécies de *Aeromonas*, e o uso da técnica de hibridação de DNA-DNA não é confiável quando se trata de espécies estreitamente relacionadas (MARTINEZ-MURCIA et al., 2005). Segundo Martinez-Murcia et al. (2007), a taxonomia desse gênero se torna complexa devido a alta similaridade inter-espécies da seqüência do gene 16S rRNA que é de 98% ou na maior parte dos casos > 99%. Graf (1999), já havia mencionado sobre a natureza relativamente conservada do 16S rRNA em *Aeromonas* spp.

Estudos filogenéticos de *Aeromonas* spp. com base em seqüências de genes *gyrB* e *rpoD* tem têm mostrado melhores resultados do que aqueles baseados em seqüências de genes rRNA 16S, particularmente quando se trata da capacidade de discriminar espécies estreitamente relacionadas (SAAVEDRA et al., 2006). Estudos recentes em genômica devem permitir a resolução de discrepâncias e controvérsias em relação às questões de taxonomia, bem como de nomenclatura que existem em torno do gênero (PARKER; SHAW, 2011). Outros genes vêm sendo apontados como ideais para distinção de espécies de *Aeromonas* como o gene CPN60. Esse gene demonstrou ser um método universal, útil, simples e rápido para a identificação e classificação filogenética de isolados de *Aeromonas* (MIÑANA-GALBIS et al., 2009).

Atualmente o genoma completo de um isolado de *Aeromonas* spp. foi sequenciado, e esse estudo poderá esclarecer e auxiliar em outros estudos a respeito desse gênero. O tamanho do genoma completo foi de 4.451.364 bp. O genoma completo está disponível no link: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/236450>> (CHUA et al., 2015).

Seshadri et al. (2006) já haviam descrito um sequenciamento do genoma completo de *A. hydrophila* ATCC 7966^T e previu a codificação protéica de 5.195 genes identificados. Descreveram ainda que esse patógeno emergente mostra-se um organismo fisiologicamente hábil, com grande capacidade metabólica e um grande potencial de virulência (SESHADRI et al., 2006).

2.2.2. Características do gênero *Aeromonas*

A palavra *Aeromonas* surge do termo Grego *aer* que significa ar ou gás, e *monas* que significa unidade (ISONHOOD; DRAKE, 2002). São bactérias Gram negativas, não formadoras de esporos, bacilos ou cocobacilos, oxidase e catalase positivas, reduzem nitratos a nitritos e são resistentes ao agente vibriostático O/129 (2,4- Diamino, 6, 7-di-isopropílico pteridina) (ARAVENA-ROMÁN et al., 2013). Ocorrem isoladamente, aos pares ou em cadeias curtas, são anaeróbias facultativas, geralmente movem-se por flagelos polares ou formam flagelos peritricosos em meio sólido, produzem ácidos e/ou gás a partir de hidratos de carbono, (JOSEPH; CARNAHAN, 1994) e crescem bem em pH entre 5,5 e 9,0 (GHENGHESH et al., 2008).

O gênero pode ser dividido em dois grupos: os isolados mesófilos, com presença de motilidade e que crescem bem em temperaturas de 35 a 37°C, sendo associados com uma variedade de infecções humanas. E, um segundo grupo denominado de psicrófilos que crescem bem em temperaturas de 22 a 25°C, estando associado a doenças em peixes imunocomprometidos (JANDA; ABBOTT, 2010). De acordo com Joseph e Carnahan (1994), a temperatura ideal de crescimento está entre 22 e 28 ou 35 e 37°C, dependendo da espécie, embora algumas cepas não cresçam a 37°C.

Podem ser isolados a partir de todos os nichos ambientais onde existem ecossistemas bacterianos, tais como peixes, alimentos, animais de estimação, invertebrados aquáticos, pássaros, carrapatos, insetos e solos (JANDA; ABBOTT, 2010). A natureza onipresente e adaptativa das *Aeromonas* spp. mostra que

podem não só sobreviver em seres humanos, solo e água, mas também em vários reservatórios animais (GALINDO et al., 2006).

É bem conhecido que a água constitui uma via importante para a contaminação com micro-organismos. Isto é especialmente verdadeiro para *Aeromonas* spp. que são comuns em águas tratadas e não tratadas (CARVALHO et al., 2012). O papel desses micro-organismos nos ciclos de nutrientes do ambiente aquático e qualquer potencial para biorremediação são desconhecidos (SESHADRI et al., 2006).

São várias as espécies de *Aeromonas* encontradas em ambientes aquáticos e as mesmas têm consideráveis potenciais de virulência (HU et al., 2012). Segundo Janda e Abbott (2010), *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* são as espécies comumente encontradas em vertebrados, invertebrados, água e alimentos. Essas bactérias também foram isoladas de vegetais orgânicos, e *A. hydrophila* e *A. schubertii* foram as espécies mais encontradas (McMAHON; WILSON, 2001).

As bactérias pertencentes a esse gênero secretam muitas proteínas extracelulares, incluindo amilase, quitinase, elastase, aerolisina, nuclease, gelatinase, lecitinase, lipase e protease, como forma de patogenicidade e adaptabilidade ao ambiente (PEMBERTON et al., 1997). Os vários flagelos, pili, e aderências produzidas são cruciais para o estabelecimento de infecção (GALINDO et al., 2006). Os principais fatores de virulência são: exotoxinas, endotoxina (LPS), presença da camada S, fímbrias ou adesinas e da capacidade para formar cápsulas (MERINO et al., 1995).

As bactérias isoladas de peixes doentes, peixes saudáveis e amostras de água muitas vezes possuem três ou mais genes de virulência em diferentes combinações, sugerindo que há uma distribuição generalizada de cepas de *Aeromonas* potencialmente virulentas no meio ambiente, que pode ser um motivo de preocupação para a saúde pública (HU et al., 2012). De acordo com Pemberton et al. (1997), a espécie *A. hydrophila* possui mecanismos que permitem se adaptar a diferentes condições ambientais.

Esses micro-organismos podem ser encontrados em alimentos e água, crescem bem e produzem toxinas em temperaturas de refrigeração, o que aumenta muito o risco de intoxicação alimentar (GALINDO et al., 2006). A presença desses micro-organismos nos alimentos de origem animal representa um problema de saúde pública para os seres humanos que entram em contato com esses alimentos (IGBINOSA et al., 2012).

Segundo Parker e Shaw (2011), essas bactérias são emergentes e causadoras de doenças infecciosas particularmente nos países em desenvolvimento e em indivíduos imunocomprometidos, nos quais presença dessas bactérias pode ser fatal (NAM; JOH, 2007). Janda e Abbott (2010), afirmaram que três principais espécies estão associadas com doença em humanos: *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* bv. *sóbria*.

Estão implicados em certo número de infecções intestinais e extra-intestinais nos seres humanos, bem como em animais (PARKER; SHAW, 2011). O panorama de doenças ligadas a este gênero inclui problemas intra-abdominais, doenças oculares, infecções de ossos e articulações, infecções no aparelho respiratório e urogenital (JANDA; ABBOTT, 2010), infecções de feridas (PARKER; SHAW, 2011).

2.3. Uso de antimicrobianos na piscicultura

O crescimento acelerado da piscicultura desencadeia uma série de acontecimentos que prejudicam o meio ambiente e a saúde humana. Isso pode ser observado no uso generalizado e irrestrito de antibióticos profiláticos especialmente em países em desenvolvimento para prevenir infecções bacterianas resultantes de deficiências sanitárias na criação de peixes (CABELLO, 2006). A piscicultura sofre atualmente graves perdas por causa de doenças infecciosas, e a evolução de cepas de bactérias resistentes pode ser ocasionada pela utilização de antimicrobianos, pesticidas e desinfetantes na prevenção de doenças e promoção do crescimento nessas criações (PANDIYAN et al., 2013).

Uma grande fração de agentes antimicrobianos que são administrados na forma de alimentos peletizados para os peixes de criações, é liberada no meio ambiente por meio da lixiviação, ou através de excreções fecais, urinárias e branquiais (POULIQUEN et al., 2007). De acordo com Cabello (2006), uma grande variedade de antibióticos usados em largas quantidades, incluindo os antibióticos não biodegradáveis úteis em medicina humana, se mantém no ambiente aquático exercendo pressão seletiva durante longos períodos de tempo, podendo resultar em uma seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos em ambientes de aquicultura e na transferência destes determinantes de resistência aos animais de terra e humanos.

A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode vir através de uma variedade de mecanismos, tais como mutação genética e transferência horizontal de genes de resistência (LI et al., 2015). Os genes de resistência a antibióticos nessas bactérias têm potencial para se difundir para outros patógenos, o que representa um risco (GUGLIELMETTI et al., 2009). Hektoen et al. (1995) afirmaram que a distribuição de agentes antibacterianos persistentes no meio aquático pode ter efeitos ecotoxicológicos e na saúde dos humanos.

De acordo com a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 42, DE 20 DE DEZEMBRO DE 1999, a tetraciclina, a eritromicina e a oxitetraciclina são antimicrobianos recomendados no tratamento de doenças causadas por bactérias em peixes (MAPA, 1999). A oxitetraciclina foi por muitos anos o agente de primeira escolha na piscicultura (HEKTOEN et al., 1995), atualmente o florfenicol também é um antimicrobiano de escolha no tratamento de enfermidades na piscicultura (POULIQUEN et al., 2007).

2.4. Uso do florfenicol na piscicultura

O Florfenicol é um antibiótico importante na medicina veterinária que é usado extensivamente na aquicultura (FERNANDEZ-ALARCON et al., 2008). Pertence a classe dos anfenicóis (PEZZA et al., 2006), sua atividade é de amplo

espectro, é bacteriostático, atuando em diversos organismos incluindo gram-negativos e gram-positivos (FLORFENICOL, veterinary-systemic, 2007).

O FFC é um antimicrobiano análogo fluorado do cloranfenicol e tianfenicol que foi produzido sinteticamente (SCHERING plough- technical monograph). No Brasil, o Aquaflor® é o primeiro antimicrobiano comercialmente registrado para uso aquícola. É um produto à base de FFC e com uma estrutura molecular única (SCHERING plough- aquaflor).

O cloranfenicol e o seu derivado fluorado florfenicol representam inibidores altamente potentes de biossíntese de proteína bacteriana (SCHWARZ et al., 2004). Inibem a síntese proteica dos micro-organismos sensíveis, ligando-se irreversivelmente à subunidade 50 S do ribossomo bacteriano, desta forma interferindo na formação do peptídeo pelo bloqueio da enzima peptidiltransferase, impedindo o alongamento da cadeia polipeptídica (SPINOSA; GÓRNIAK; BERNARDI, 2011).

O FFC é quimicamente diferente do cloranfenicol, pois há ausência do grupo funcional que é responsável no cloranfenicol por supressão da medula óssea e anemia aplástica em humanos (SCHERING plough- technical monograph). O risco de induzir anemia aplástica em humanos é devido a uma substituição do grupo nitro (NO_3) pelo grupo sulfonilmetil (CH_3SO_2) (SUN et al., 2010). O grupo hidroxila substituído pela molécula de flúor elimina problemas de resistência bacteriana relacionados à inativação pela enzima Cloranfenicol Acetil Transferase (CAT) (SCHERING plough- aquaflor).

O FFC tem atividade contra uma ampla gama de agentes patogênicos de peixes, incluindo *Aeromonas salmonicida* e *Vibrio salmonicida*. Na aquicultura o FFC é geralmente adicionado aos alimentos para peixes, e é administrado em uma dose de 10 mg/kg de peso corporal por 10 dias consecutivos para o tratamento de doenças bacterianas (FENG et al., 2008). Segundo Park et al. (2008) é caracterizado por uma elevada biodisponibilidade, boa penetração no tecido e eliminação rápida.

Esse antimicrobiano foi aprovado na União Européia para o uso em bovinos e em suínos em 1995 e 2000, respectivamente, no tratamento de pododermatite infecciosa em bovinos e tratamento de furunculose causada por *Aeromonas salmonicida* (SCHWARZ et al., 2004). Atualmente é o único permitido para o uso na aquicultura no Brasil (MAPA, 2010 citado por ROSSI, 2012).

2.5. Resistência de *Aeromonas* spp. aos antimicrobianos

Segundo Trabulsi e Alterthum (2004), a maioria das *Aeromonas* spp. é resistente à penicilina, ampicilina e carbenicilina. Em geral, são sensíveis às cefalosporinas, aminoglicosídeos, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim e quinolonas. Hatha et al. (2005) afirmaram que essas bactérias apresentam resistência natural a ampicilina, mas adquiriram resistência a amoxicilina, polimixina B, novobiocina e oxitetraciclina. A oxitetraciclina foi um antibiótico muito usado na piscicultura para tratar várias doenças, o que resultou em um elevado grau de seleção de cepas resistentes a esse antimicrobiano (HATHA et al., 2005).

De acordo com Jacobs e Chenia (2007) a resistência desse gênero aos β -lactâmicos (penicilinas e muitas cefalosporinas) é ocasionada devido a produção natural de β -lactamase ou indução da atividade dessa enzima. As bactérias do gênero *Aeromonas* apresentam uma alta incidência de resistência aos antimicrobianos (GHENGHESH et al., 2008), a maioria são resistentes a múltiplas drogas, e muitas cepas apresentam resistência às quinolonas e fluoroquinolonas, estreptomicina, oxitetraciclina, cloranfenicol, florfenicol, sulfametoxazol e trimetoprim (NAVINER et al., 2011).

De acordo com Carvalho et al. (2012) *Aeromonas* spp. podem ser resistentes a pelo menos duas classes de agentes antimicrobianos, podendo também apresentar resistência a três ou mais classes. A aquisição de genes de virulência e resistência pelos isolados de *Aeromonas* pode se dar através de seus ancestrais ou pode ser obtida por transferência lateral (LI et al., 2011). Jacobs e Chenia (2007) destacam o risco de estas bactérias servirem como um reservatório de genes de resistência que pode ser transferido para outras

bactérias no ambiente aquático. Gastalho et al. (2014) afirmaram que há capacidade de transferência horizontal de genes de resistência aos antimicrobianos de bactérias aquáticas para bactérias tais como: *Escherichia coli*.

2.5.1 Resistência ao florfenicol mediada pelo gene *floR*

O mecanismo bacteriano de resistência ao cloranfenicol mais frequentemente encontrado é a inativação do antibiótico devido à acetilação promovida pela enzima cloranfenicol-acetiltransferase. A acetilação dos grupos hidroxila do cloranfenicol impedem que ele se ligue à subunidade 50 S do ribossomo. Foram descritos também outros mecanismos de resistência, como sistemas de efluxo, inativação de fosfotransferases e mutação de locais-alvo ou barreiras de permeabilidade (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2011).

Gordon et al. (2008) fizeram o primeiro relato do gene *floR* (proteína de resistência ao florfenicol/cloranfenicol) em *Aeromonas bestiarum*. Esse gene confere resistência ao antimicrobiano florfenicol, que é amplamente utilizado na piscicultura no tratamento de enfermidades (FERNANDEZ-ALARCON, et al 2008). A resistência ao cloranfenicol e florfenicol entre *Aeromonas* spp. é identificada com bastante frequência (PIOTROWSKA; POPOWSKA, 2014). Segundo o estudo de Fernandez-Alarcon et al. (2008), cepas que possuem o gene *floR*, geralmente, são multidrogas resistentes.

Vários estudos relatam a presença do gene *floR* em bactérias mediando resistência ao florfenicol, como em *Edwardsiella ictaluri* (WELCH et al., 2009), *Escherichia coli* (DU et al., 2004) e *Salmonella* spp. (DOUBLET et al, 2004). O estudo de FERNANDEZ-ALARCON et al. (2010) relatou a presença desse gene em muitos bacilos gram negativos isolados de peixes como: *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Pantoea* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Sphingobacterium multivorum*, *Kluyvera ascorbata*, *Hafnia alvei*, *Raoultella terrigena* e *Cedecea davisae*. Todos os isolados que continham o gene foram resistentes ao florfenicol e vários outros antimicrobianos.

Vários genes que conferem resistência combinada ao florfenicol e cloranfenicol tem sido publicados na literatura, dentre eles estão o *pp-flo*, *CMLA-like*, *floSt*, *flo* e *floR* (SCHWARZ et al., 2004). O elemento SXT de *Vibrio cholerae* que foi relatado como um importante indutor de resistência ao cloranfenicol, também foi relatado por Gordon et al., (2008), que afirmaram que 7,5 kb do plasmídeo contendo o gene *floR* possuía 100% de identidade com a sequência de nucleotídeos para três segmentos não contíguos do elemento SXT de *Vibrio cholerae*.

Segundo Cloeckert et al., (2000), o gene *floR* pode ser encontrado em plasmídeos, transposons ou ilhas genômicas. Mecanismos de efluxo são responsáveis pela resistência a uma variedade de agentes antimicrobianos. Os genes que codificam os sistemas específicos de efluxo são frequentemente associados com os elementos genéticos móveis que podem facilmente ser trocados entre as bactérias. Sistemas de efluxo específicos foram relacionados principalmente com resistências aos macrolídeos, lincosamidas e/ou tetraciclina, estreptograminas, assim como cloranfenicol/florfenicol em bactérias gram-positivas e gram-negativas (BUTAYE et al., 2003).

O gene *floR* está relacionado com a codificação de uma bomba de efluxo (DU et al., 2004). Esse gene possui uma CDS de 867 pb, codificando uma proteína de 289 aminoácidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/440135194>). Gordon et al., (2008) relataram que a proteína codificada por esse gene pertence à família de sistemas de efluxo Superfamília dos Facilitadores Majoritários (MFS) (<http://prosite.expasy.org/>). Os transportadores MFS são portadores secundários de polipeptídeos únicos, capazes apenas de transportar pequenos solutos em resposta à gradientes de íons quimiosmóticos (PAO et al., 1998).

Proteínas MFS facilitam o transporte através do citoplasma ou membranas internas de uma variedade de substratos, incluindo íons, fosfatos de açúcar, fármacos, nucleosídeos, neurotransmissores, aminoácidos e peptídeos. São compostas tipicamente por 400 a 600 aminoácidos, e contêm 12 alfa hélices transmembranares (TMs). Proteínas MFS funcionam através de um único local de ligação ao substrato, e em bactérias funcionam principalmente para a absorção

de nutrientes, e como bombas de efluxo de droga conferindo resistência aos antibióticos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>).

Os sistemas de efluxo em bactérias protegem as células dos antibióticos por transportar ativamente os compostos para fora do citoplasma e/ou periplasma e limitar assim a sua acumulação em seu local de ação (LYNCH 2006). O mecanismo exato de transporte da droga para fora da célula ainda é controverso. Entre os diferentes modelos que têm sido propostos, os dois mais prováveis de estarem presentes nas bombas de efluxo podem atuar agindo como “aspiradores” hidrofóbicos ou como flipases (BAMBEKE et al, 2000).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Caracterizar o gene *floR* em isolados de *Aeromonas spp.* e verificar se a presença desse gene está associada com a resistência ao florfenicol em *Aeromonas spp.* obtidas do Vale do São Francisco.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar isolados de *Aeromonas* por meio de sequenciamento de DNA;
- Detectar a presença do gene *floR* em isolados de *Aeromonas spp.*;
- Verificar a presença de polimorfismos no gene *floR* dos isolados avaliados;
- Predizer se as mutações detectadas podem alterar a função da proteína codificada por esse gene;
- Verificar se os polimorfismos detectados no gene *floR* influenciam a estrutura da proteína codificada por esse gene;
- Testar a resistência de isolados de *Aeromonas spp.* ao florfenicol;
- Verificar se a resistência de isolados de *Aeromonas spp.* ao florfenicol está relacionada com o funcionamento de bombas de efluxo;

-Verificar se a resistência ao florfenicol está relacionada com a presença do gene *flor* e, se os polimorfismos detectados no gene influenciam a resistência ao florfenicol.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem das amostras

Foram utilizados 45 isolados de *Aeromonas spp.* provenientes da bacterioteca do laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do campus de Ciências Agrárias da UNIVASF. Esses isolados foram obtidos a partir do rim, tegumento, intestino e lesões de tilápias (*Oreochromis niloticus*) e pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*) e de *pool* de branchonetas (*Dendrocephalus brasiliensis*) destinadas à alimentação de peixes carnívoros. Os animais foram provenientes da Barragem de Sobradinho/BA e do Projeto Bebedouro da CODEVASF/PE e, essas coletas foram realizadas em 2008 e 2009. Esses isolados foram previamente caracterizados por meio de suas características morfológicas, tintoriais, bioquímicas (QUINN et al., 1994) e, no presente estudo por sequenciamento de parte do gene rRNA 16S. Os isolados estão armazenados em meio Agar soja tripticaseína (TSA) na bacterioteca do laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do campus de Ciências Agrárias da UNIVASF, sendo repicados a cada 15 dias.

4.2. Extração de DNA genômico

Os DNAs dos isolados de *Aeromonas spp.* foram termo-extraídos em um volume final de 500µl. Para isso, inicialmente os isolados foram repicados em meio TSA a 28°. C por 24h. Em seguida, 10 unidades formadoras de colônias (UFC) foram colocadas em 500µl de água ultrapura estéril. A lise térmica da célula bacteriana para exposição do DNA foi realizada por incubação a 100 °C por 11 minutos em banho-seco, seguida por incubação a 4°C por 4 minutos. Ao final,

as amostras foram centrifugadas a 14000g por 2 minutos e o sobrenadante armazenado a – 20°C (SÁ et al. 2013).

4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para os genes *rRNA 16S* e *floR*

A caracterização dos isolados foi realizada por sequenciamento de parte do gene *rRNA 16S*. Para isso, o DNA bacteriano foi amplificado por PCR com a utilização de iniciadores universais de procariotos 13R (5'AGGCCCGGGAACGTATTAC-3') e 516F (5'-TGCCAGCAGCCGCGGTAA-3') (FREDERICKS; RELMAN, 1998). A reação constou de tampão de enzima 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50 mM de KCl), 1,6 mM de MgCl₂, 0,16 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada iniciador, 2.5 U de Taq polimerase (Taq Platinum, Invitrogen®) e 2 µL de DNA molde não quantificado em um volume final de 20µL. Os ciclos de amplificação foram constituídos em termociclador (AMPLITHERM®), com desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento específico do iniciador a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, seguido de uma extensão final a uma temperatura de 72°C por 7 minutos.

A presença do gene *floR* nos isolados de *Aeromonas spp.* foi avaliada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com a utilização dos iniciadores *floR1* (5'-CCCGCTATGATCCAACACTCAC-3') e *floR2* (5'-ACCCACATCGGTAGGATGAA-3') que amplificam um fragmento de 803 pb do gene (GORDON et al., 2008). Esses primers foram desenhados para *A. bestiarum*, mas possuem homologia com a sequência as outras espécies de *Aeromonas*.

Na reação do gene *floR* foram utilizados os seguintes reagentes: tampão de enzima 1X (10 mM de Tris-HCl Ph 8,5, 50 mM de KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 0,6 µM de cada iniciador, 2,5 U de Taq polimerase (Taq Platinum, Invitrogen®) e 5µL de DNA molde em um volume final de 25 µL. Os ciclos de amplificação foram constituídos em termociclador (AMPLITHERM®), com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação

a 95°C por 1 minuto, anelamento específico do iniciador a 59°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final a uma temperatura de 72°C por 5 minutos. Amostras com resultado negativo para a presença desse gene foram analisadas em duplicatas.

Os produtos de amplificação dos isolados foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo a uma concentração de 0,01g/mL.

4.4. Purificação do DNA para sequenciamento

As amostras amplificadas para os genes rRNA 16S e *floR* foram purificadas em coluna de celulose (PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit, Invitrogen®). As bandas foram recortadas do gel de agarose, em seguida pesadas e depositadas em microtubos de 1,5mL com 600µl do Tampão de Solubilização (L3). Em seguida os tubos foram colocados em banho seco a 50°C por 10 minutos. Os tubos foram invertidos a cada 3 minutos. Após a dissolução do gel, se procedeu com incubação por mais 5 minutos e, em seguida o conteúdo do microtubo foi colocado em coluna de celulose. Essa coluna foi centrifugada a 12.000g por 1,5 minuto e o líquido que passou pela coluna foi descartado do tubo. Posteriormente foi adicionado 600µl do Tampão de lavagem (W1) e o tubo foi centrifugado a 12.000g por 1,5 minuto e o líquido que passou pela coluna foi descartado do tubo. Foi realizada outra centrifugação por mais 3 minutos e descartado o líquido que passou pela coluna. A coluna foi colocada sobre um novo microtubo de 1,5mL e foram adicionados 50µl de Tampão de eluição (E1) no centro da coluna. Procedeu-se com incubação por 1 minuto a temperatura ambiente e, em seguida com a centrifugação a 12.000g por 1,5 minuto. O líquido eluído no microtubo foi armazenado a -20° C.

4.5. Sequenciamento dos produtos amplificados dos genes *rRNA 16S* e *floR* e análise dos eletroferogramas

As amostras purificadas foram enviadas para sequenciamento “Sanger” em empresa particular (HELIXXA-Bases for Life). As sequências obtidas foram analisadas pelo programa de *base calling Phred* (EWING et al. 1998; EWING; GREEN 1998), que reconhece dados de cromatogramas e identifica a sequência de DNA gerada, atribuindo um valor de qualidade a cada nucleotídeo identificado. Quanto maior o valor de qualidade de *Phred*, menor a probabilidade de ter ocorrido um erro na designação do nucleotídeo. Somente foram consideradas nas análises posteriores as sequências com alto valor de *Phred* (valor de *Phred* maior que 20). Em seguida, *contigs* foram montados com o programa CAP3 utilizando-se as sequências Forward e Reverse sequenciadas para cada amostra (HUANG et al. 1999).

4.6. Identificação dos isolados

Os “contigs” de alta qualidade foram utilizados para confirmação de gênero para identificação dos isolados. Para isso, os contigs foram analisados com a ferramenta “Basic Local Align Sequence Tool” (BLAST, 2014) utilizando-se o banco de dados “nucleotide collection (nr/nt)” e a opção “MegaBlast”. O resultado foi obtido de sequências com 100% de Identidade, menor e-Value e maior Score Total.

4.7. Identificação de polimorfismos no gene *floR*

Os contigs obtidos no item 4.5 foram alinhados contra uma sequência referência do gene *floR* oriunda de *A. bestiarum* (gi|148274163:9790-11004) obtida do banco de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificação de polimorfismos de base única (SNP).

O alinhamento foi realizado por meio da utilização do programa CLUSTALW (LARKIN et al., 2007), implementado no software MEGA6 (TAMURA et al., 2013). Com base no alinhamento, foram identificados os sítios polimórficos em relação à sequência de referência e, haplótipos foram construídos para o conjunto de isolados analisados.

4.8. Predição de alteração de função da proteína codificada pelo gene floR em função da presença de polimorfismos no gene

Inicialmente procedeu-se com obtenção da sequência de aminoácidos codificada pelos diferentes haplótipos identificados. Para isso, utilizou-se o frame de leitura da sequência referência do gene *floR* (gi|148274163:9790-11004). Esta etapa foi realizada no software MEGA6. Para confirmar a correta tradução da sequência de nucleotídeos, as sequências traduzidas foram comparadas com as sequências de aminoácidos depositadas no banco de dados do NCBI para esse gene (YP_001220605.1, ABQ41442.1, DAA64637.1, WP_011931116.1).

Para prever o efeito da alteração de aminoácidos na estrutura da proteína em função dos polimorfismos detectados, foram utilizados os programas SIFT (NG; HENIKOFF, 2001) e Polyphen 2 (ADZHUBEI et al., 2010).

O algoritmo do SIFT (NG; HENIKOFF, 2001) faz um PSI-BLAST e em seguida realiza um alinhamento entre seqüências que possuam acima de 90% de similaridade. Essas seqüências são utilizadas para a construção de escores de conservação das regiões da proteína e partindo desses escores são calculadas as probabilidades de substituição para cada aminoácido da proteína e, é construído um escore onde valores inferiores a 0,05 são preditos como mutações intolerantes ou deletérias, já para valores superiores a 0,05 são preditos como tolerantes (NG; HENIKOFF, 2001).

O algoritmo do Polyphen 2 faz também um BLAST e alinhamento múltiplo, que posteriormente é usado pelo software PSIC (Position-Specific Independent Counts) (<http://strand.imb.ac.ru/PSIC/>) para calcular uma matriz de “perfis de

escores”, utilizando o banco de dados da SWALL e SwissProt. O Polyphen 2 atribui três classificações para as substituições: provavelmente prejudicial, possivelmente prejudicial e benigna. Esta classificação baseia-se nas características químicas da substituição, no alinhamento de sequências homólogas e nas características tridimensionais das proteínas (ADZHUBEI et al., 2010).

4.9. Modelagem da proteína codificada pelo gene *floR*

Nessa análise buscou-se verificar se os diferentes haplótipos identificados poderiam alterar a estrutura da proteína codificada pelo gene *floR*. Para isso, foram modeladas as proteínas codificadas pelos diferentes haplótipos identificados e a proteína codificada pelo gene referência (gi|148274163:9790-11004). Todas as análises foram realizadas individualmente para cada haplótipo e para o gene referência.

Para modelagem estrutural das proteínas (codificadas pelos diferentes haplótipos) por homologia foi utilizado o software Modeller (SALI; BLUNDELL, 1993).

Inicialmente, foram realizadas pesquisas nos bancos de dados: Blast-Protein (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) com o intuito de encontrar proteínas que possuíssem estruturas tridimensionais resolvidas para serem utilizadas como moldes, sendo selecionados três moldes do PDB: 3wdo, 4lds e 4ja3. Os moldes 3wdo e 4ja3 são proteínas da família MFS e pertencem a *Escherichia coli* e o molde 4lds é também uma proteína da família MFS, mas pertence a um *Staphylococcus epidermidis*.

Os principais valores utilizados para classificação desses moldes são a identidade entre as seqüências, onde o que se deseja são valores acima de 25% quando o número de resíduos é superior a 80, o E-value, o escore geral e o número de gaps.

Na construção dos modelos inicialmente foi realizado um alinhamento global entre os moldes (3wdo, 4lds e 4ja3) e as proteínas a serem avaliadas (codificada pelo gene referência e pelos haplótipos). Esse alinhamento dos moldes com as proteínas a serem analisadas foi realizado individualmente para cada proteína. A partir desse alinhamento o programa transferiu as informações extraídas da estrutura 3D das proteínas moldes para os modelos construídos para a proteína codificada por cada haplótipo e pelo gene referência. Foram construídos 5 modelos para cada uma das proteínas modeladas (proteínas codificadas por cada haplótipo e pelo gene referência) e, o próprio Modeller atribuiu um score, o “molpdf”, onde o que possuir menor valor é considerado o melhor modelo para a proteína modelada.

Para as análises da qualidade do modelo gerado para cada proteína modelada foram utilizados três softwares: PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) que avalia a exatidão estereoquímica, WHATIF (VRIENDS; SANDER, 1993) que avalia a qualidade do empacotamento e VERIFY3D (BOWIE et al., 1991) que avalia a confiabilidade do enovelamento.

A similaridade das estruturas tridimensionais da proteína referência (*A. bestiarum*) foi comparada com as estruturas tridimensionais das proteínas codificadas pelos haplótipos pelo software TM-align (ZHANG; SKOLNICK, 2005) para predição de alteração estrutural em função dos diferentes haplótipos.

4.10. Análise da resistência dos isolados de *Aeromonas* spp. ao florfenicol

A resistência ao florfenicol pelos isolados de *Aeromonas* spp. foi verificada pelo teste de Microdiluição em caldo.

O teste foi realizado de acordo com o protocolo (CLSI, 2006). A concentração bactericida mínima (CBM) do antimicrobiano foi determinada. O florfenicol (Roflin®) primeiramente foi diluído em Tween para que se fosse possível realizar o teste.

Os isolados foram repicados em TSA, incubados a 28°C por 24 horas e, após esse período foi realizada a suspensão bacteriana de acordo com a escala 0,5 de MacFarland (BioMeriéux, França). Esta suspensão foi obtida em tubos contendo solução salina estéril 0,85% e, posteriormente, uma alíquota de 150µL foi inoculada em tubos contendo 15mL de caldo Mueller-Hinton (MH).

Com o auxílio de uma pipeta multicanal, foram transferidos 180µL do caldo MH para os primeiros poços da microplaca e 100µL nos demais poços. Em seguida foram transferidos 20µL do antimicrobiano florfenicol (Roflin®) nos primeiros poços da placa e distribuídos nos demais poços com a pipeta multicanal, homogeneizando e transferindo 100µL até o último poço e descartando a sobra deste. A diluição do antibiótico após as transferências de 100µL constou de 75mg/mL, 37,5mg/mL, 18,75mg/mL, 9,37mg/mL, 4,68mg/mL, 2,34mg/mL, 1,17mg/mL, 585µg/mL, 292µg/mL, 146µg/mL, 73,1µg/mL, 36,56µg/mL, 18,2µg/mL, 9,14µg/mL, 4,57µg/mL, 2,28µg/mL, 1,14µg/mL, 0,57µg/mL, 0,285µg/mL, 0,142µg/mL, 0,071µg/mL, 0,035µg/mL, 0,017µg/mL, 0,0085µg/mL ao final totalizando 24 diluições.

Em seguida, 100µL do caldo MH com a bactéria foram transferidos para microplacas, que foram incubadas a 28°C por 24 horas. As análises foram realizadas em triplicatas para cada isolado, sendo utilizado como controle negativo o caldo MH (sem florfenicol) e como controle positivo o caldo MH + bactéria (sem florfenicol), também foi realizado o controle do diluente (Tween 80).

Após esse período foi realizada a CBM, com auxílio de replicador de 96 pontos e posteriormente as amostras foram incubadas a 28° C por 24 horas. A leitura da CBM foi realizada de acordo com o *breakpoint* do cloranfenicol (8 µg/ml) (CLSI, 2006).

4.11. Análise da resistência dos isolados de Aeromonas spp. ao florfenicol na presença do Carbonil Cianeto m-Clorofenil Hidrazona (CCCP).

A resistência ao florfenicol na presença do CCCP (inibidor de bomba de efluxo) pelos isolados de *Aeromonas* spp. foi verificada pelo teste de Microdiluição

em caldo. Foram utilizados 3 isolados referentes a cada haplótipo encontrado nesse estudo (TTA, TAA e CTG), os quais foram resistentes ao florfenicol.

Essa análise foi realizada com a utilização do teste de Microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo (CLSI, 2006), sendo a concentração bactericida mínima (CBM) do antimicrobiano determinada na presença do inibidor de bombas de efluxo. O florfenicol (Roflin®) primeiramente foi diluído em Tween 80 para que se seja possível realizar o teste e o reagente CCCP foi diluído em acetona.

Os isolados avaliados foram repicados em Agar soja tripticaseína (TSA), incubados a 28°C por 24 horas e, após esse período foi realizada uma suspensão bacteriana de acordo com a escala 0,5 de MacFarland (BioMerioux, França). Esta suspensão foi obtida em tubos contendo solução salina estéril 0,85% e, posteriormente, uma alíquota de 150µL foi inoculada em tubos contendo 15mL de caldo Mueller-Hinton (MH).

Com o auxílio de uma pipeta multicanal foram transferidos 180µL do caldo MH para os primeiros poços da microplaca e 100µL nos demais poços. Em seguida foram transferidos 20µL do antimicrobiano florfenicol (Roflin®) nos primeiros poços da placa e distribuídos nos demais poços com a pipeta multicanal, homogeneizando e transferindo 100µL até o último poço e descartando a sobra deste. A diluição do antibiótico após as transferências de 100µL constou de 75mg/mL, 37,5mg/mL, 18,75mg/mL, 9,37mg/mL, 4,68mg/mL, 2,34mg/mL, 1,17mg/mL, 585µg/mL, 292µg/mL, 146µg/mL, 73,1µg/mL, 36,56µg/mL, 18,2µg/mL, 9,14µg/mL, 4,57µg/mL, 2,28µg/mL, 1,14µg/mL, 0,57µg/mL, 0,285µg/mL, 0,142µg/mL, 0,071µg/mL, 0,035µg/mL, 0,017µg/mL, 0,0085µg/mL, ao final totalizando 24 diluições.

Após esse procedimento foi adicionado 20µL do CCCP (0,04M) em cada poço. Em seguida, 100µL do caldo MH com a bactéria foram transferidos para microplacas. Posteriormente essas microplacas foram incubadas a 28° C por 24 horas. As análises foram realizadas em triplicatas para cada isolado, sendo utilizado como controle negativo o caldo MH (sem florfenicol) e como controle positivo o caldo MH + bactéria (sem florfenicol), também foi realizado o controle

do diluente do florfenicol e do CCCP (Tween 80 e acetona, respectivamente, acrescidos de bactéria).

Após esse período foi realizada a CBM, com auxílio de replicador de 96 pontos e posteriormente as amostras foram incubadas a 28° C por 24 horas. Após 24 horas foi possível verificar se houve diferença de crescimento das bactérias na presença do CCCP. A leitura da CBM foi realizada de acordo com o *breakpoint* do cloranfenicol (8 µg/ml) (CLSI, 2006).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 45 isolados bacterianos avaliados e previamente caracterizados como pertencentes ao gênero *Aeromonas* por métodos fenotípicos e bioquímicos, 29 foram confirmados como *Aeromonas* spp. através do sequenciamento de parte do gene rRNA 16S. Janda e Abbott (2010) afirmaram que há uma dificuldade em se separar espécies de *Aeromonas* por métodos bioquímicos devido à falta de “chaves de identificação” padronizadas que separe as espécies corretamente, levando a interpretações erradas nos testes realizados. A identificação do gênero *Aeromonas* através de testes bioquímicos também pode ser equivocada porque os resultados desses testes podem sofrer influências de parâmetros físicos como de pH, temperatura e de substrato de crescimento, sendo assim importante a utilização de métodos moleculares como o sequenciamento de rRNA 16S para a identificação do gênero (NAWAZ et al., 2006).

No entanto, de acordo com Martinez-Murcia et al. (2005), a utilização do gene rRNA 16S para identificar espécies de *Aeromonas* é limitada, pois em algumas espécies a sequência é altamente conservada como no caso das espécies *A. salmonicida* e *A. bestiarum* que diferem por apenas dois nucleotídeos nas posições 1011 e 1018. Alinhamentos de sequências de *A. sobria* e *A. veronii* mostraram que essas espécies não poderiam ser diferenciadas pelo gene rRNA 16S devido aos altos níveis de similaridade na região amplificada pelos iniciadores (TACÃO et al., 2005). Yanez et al. (2003) em seu estudo,

comprovaram que esse gene não separa espécies estritamente relacionadas, evidenciando a utilidade do gene rRNA 16S apenas para confirmação de gênero.

Vinte e sete isolados confirmados para *Aeromonas* spp. foram testados quanto a presença do gene *floR*, sendo que 14 foram positivos quanto a presença desse gene (**Anexo 1**). Esse resultado demonstra que os isolados vêm sofrendo seleção a favor da manutenção desse gene que confere resistência ao florfenicol. Essa alta incidência de isolados contendo a informação genética necessária para a manifestação da resistência a esse antibiótico pode servir de alerta aos produtores da região, pois em um futuro próximo a utilização desse antibiótico pode não ser mais efetiva no combate a esses patógenos.

Verner et al. (2009) em seu estudo detectaram a presença do gene *floR* em 16 dos 93 isolados de peixes ornamentais, dois desses isolados foram identificados como *A. hydrophila* e *A. punctata*, possuíam o gene *floR* e também apresentaram resistência ao cloranfenicol e florfenicol. O primeiro relato desse gene em *Aeromonas* foi na espécie *A. bestiarum* em 2008, quando Gordon et al. (2008) confirmaram que a resistência ao florfenicol era devido a presença do gene *floR* e que o mesmo poderia ser mediado por um plasmídeo que carregava também outros genes de resistência a antibióticos.

Dentre as 14 amostras positivas para o gene *floR*, 10 tiveram parte desse gene sequenciado. Com base no alinhamento das 10 sequências obtidas para o gene *floR* foram identificados três sítios polimórficos em relação à sequência de referência (*A. bestiarum*). O primeiro sítio consistiu na transição T-C na posição 479 do gene, o segundo sítio consistiu na transversão A-T na posição 683 e o terceiro sítio consistiu na transição G-A na posição 721. Diante disso, foi possível observar nos isolados a presença de três diferentes haplótipos (CTG, TAA, TTA) (**Tabela 1**). É bem relatado na literatura que as mutações juntamente com a transferência horizontal de genes são importantes mecanismos para o desenvolvimento de resistência em bactérias (BAYM et al., 2016). Entretanto, muitas vezes um única mutação não é suficiente para induzir uma alteração no perfil de sensibilidade das bactérias, como por exemplo o que ocorre com as

fluoroquinolonas (JALAL et al., 2000; WANG et al., 2001; WEIGEL et al., 2001; VOGWILL; CRAIG MACLEAN, 2014).

Tabela 1. Polimorfismos identificados nos isolados de *Aeromonas* spp.

Identificador	SNP_479	SNP_683	SNP_721	Identificação do Haplótipo
gi 148274163:979011004	T	A	G	-
Isolado 35	C	T	G	479C_683T_721G
Isolado 11	C	T	G	479C_683T_721G
Isolado 15	C	T	G	479C_683T_721G
Isolado 22	C	T	G	479C_683T_721G
Isolado G36	C	T	G	479C_683T_721G
Isolado A10	T	A	A	479T_683A_721A
Isolado G38	T	A	A	479T_683A_721A
Isolado P16	T	A	A	479T_683A_721A
Isolado P22	T	A	A	479T_683A_721A
Isolado G4	T	T	A	479T_683T_721A

* gi|148274163:979011004: sequência de referência de *Aeromonas bestiarium*

Os três sítios polimórficos identificados puderam ser classificados como mutações não sinônimas, ou seja, levaram à troca de aminoácidos na cadeia polipeptídica. O SNP_479 causa a troca de valina (V) para alanina (A) na posição 160 da cadeia polipeptídica, o SNP_683 ocasiona uma alteração de tirosina (Y) para fenilalanina (F) na posição 228 da cadeia polipeptídica e o SNP_721 leva a troca de uma glicina (G) para uma serina (S) na posição 241 da cadeia polipeptídica (**Tabela 2**).

Tabela 2. Alterações de aminoácidos na cadeia polipeptídica segundo os polimorfismos detectados

Identificador	Haplótipo	Posição 160 na proteína	Posição 228 na proteína	Posição 241 na proteína
gi 148274163:979011004	TAG	Valina	Fenilalanina	Glicina
479C_683T_721G	CTG	Alanina	Tirosina	Glicina
479T_683A_721^a	TAA	Valina	Fenilalanina	Serina
479T_683T_721^a	TTA	Valina	Tirosina	Serina

* gi|148274163:979011004: sequência de referência.

Na literatura ainda não foram encontrados relatos de estudos apresentando polimorfismos no gene *floR*. Polimorfismos de nucleotídeo único não sinônimos

(nsSNPs), ocorrem em regiões codificadoras e resultam em polimorfismos de um único aminoácido (SAPs) com potencial para alterar a função da proteína através da alteração da sua estrutura (CAPRIOTTI; ALTMAN, 2011). Os Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são de grande importância, porque essas alterações podem afetar a estabilidade das proteínas e complexos proteína-proteína (TENG et al., 2009). Um grande número de SNPs podem ser funcionalmente neutros, mas quando ocorrem em regiões codificantes e reguladoras podem causar efeitos deletérios sobre as funções das proteínas (BAO; CUI, 2005).

O algoritmo SIFT utiliza sequências homólogas para prever se a substituição de um aminoácido afetará a função da proteína e, portanto, potencialmente alterar o fenótipo (NG; HENIKOFF, 2003). Usando o programa SIFT nesse estudo, foi possível observar que a substituição na posição 160 de uma valina para uma alanina foi considerada como tolerante com uma pontuação de 1,00, a substituição na posição 228 de uma fenilalanina para uma tirosina também foi considerada como tolerante com uma pontuação de 1,00 e, a substituição na posição 241 de uma glicina para uma serina foi prevista como tolerante com uma pontuação de 0,17 (**Tabela 3**).

Tabela 3. Resultados referentes ao algoritmo SIFT na predição de alteração de função da proteína codificada pelo gene *floR*

POSIÇÃO DO AMINOÁCIDO NA PROTEINA	PREDIÇÃO	SCORE
160	Tolerante	1,0
228	Tolerante	1,0
241	Tolerante	0,17

De acordo com o SIFT valores inferiores a 0,05 são preditos como mutações intolerantes ou deletérias, já para valores superiores a 0,05 são preditas como tolerantes. A substituição na posição 241 teve uma pontuação mais baixa que as outras duas substituições nas posições 160 e 228, mas ainda foi considerada como tolerada.

O algoritmo PolyPhen classifica o SNPs como "benigno", "possivelmente prejudicial" ou "provavelmente prejudicial" (ADZHUBEI et al., 2010). Os

resultados obtidos nesse estudo mostraram que a substituição na posição 241 foi classificada como provavelmente prejudicial, isto é, tem chances dessa mutação provocar alguma alteração que ocasione ganho ou perda da função (**Figura 1**). As mutações nas posições 160 (**Figura 2**) e 228 (**Figura 3**) foram consideradas benignas.

De acordo com o Polyphen a troca de aminoácido na posição 241 pode levar a alguma alteração de ganho ou perda na função e, esse resultado pode ser explicado pela alteração de aminoácidos com propriedades químicas diferentes (Glicina/Serina), onde a glicina é apolar e não apresenta o carbono quiral e a serina é polar com presença de um carbono quiral. Para todos os aminoácidos comuns, exceto a glicina, o carbono α está ligado a quatro diferentes grupos: um grupo carboxila, um grupo amino, um grupo R e um átomo de hidrogênio (na glicina o grupo R é outro átomo de hidrogênio) (LEHNINGER, 2006).

Figura 1. Resultado apresentado pelo PolyPhen para o SNP_721 que ocasiona alteração de uma glicina (G) para uma serina (S) na posição 241 da cadeia polipeptídica

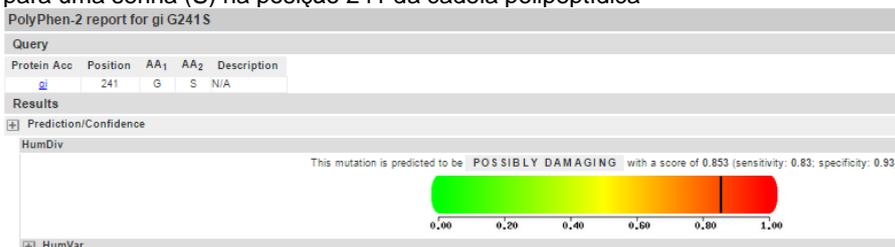


Figura 2. Resultado apresentado pelo PolyPhen para o SNP_479 que ocasiona alteração de valina (V) para alanina (A) na posição 160 da cadeia polipeptídica.

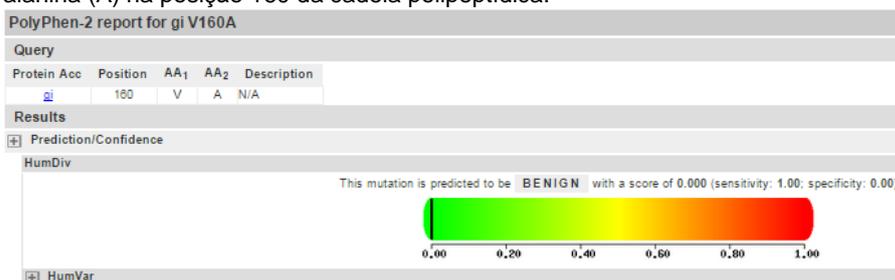
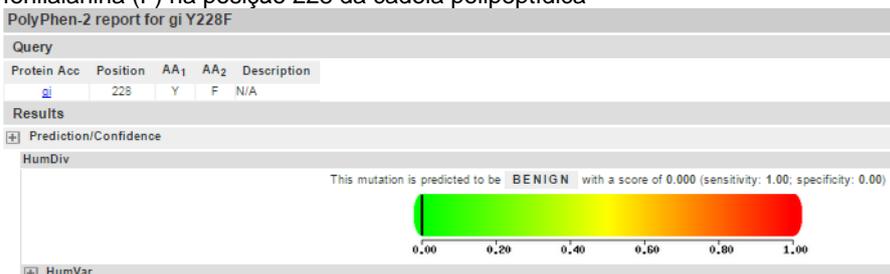


Figura 3. Resultado apresentado pelo PolyPhen para o SNP_683 que ocasiona alteração de tirosina (Y) para fenilalanina (F) na posição 228 da cadeia polipeptídica



Muitos autores utilizam o SITF e PolyPhen para prever alteração de função proteica, principalmente em humanos, como em um estudo realizado por Goswami (2015), onde foram analisados 16 nsSNPs de um enzima envolvida na biossíntese de hormônios esteroides em humanos (HSD3B2) e, observou-se que segundo os algoritmos SITF e PolyPhen, oito nsSNPs foram classificados como possivelmente prejudiciais com valores inferiores a 0,05. Esse autor afirmou que essa substituição de aminoácido pode ocasionar alteração na relação estrutura-função e que essas mutações podem estar associadas a doenças. Com micro-organismos esses estudos são escassos e, com o gene *floR* em *Aeromonas* são inexistentes. Resaltando a importância desse trabalho.

Todos os nsSNPs podem potencialmente afetar a estrutura ou função das proteínas expressas e podem ter um impacto sobre doenças complexas (NAKKEN et al, 2007). Para verificação se esse nsSNPs vai afetar a função da proteína é necessário que haja uma avaliação mais detalhada partindo da modelagem estrutural da proteína e de estudos “*in vitro*”.

Para a modelagem das proteínas foi inicialmente realizada a modelagem da proteína referência de *A. bestiarum* com a utilização dos moldes 3wdo, 4lds e 4ja3 que já possuíam a proteína resolvida (**Tabela 4**). Esse modelo foi criado para verificação de similaridade entre a proteína referência e os 3 moldes selecionados, para posterior modelagem das proteínas codificadas pelos diferentes haplótipos identificados no presente estudo. O Modeller gerou 5 modelos e foi atribuído um score, o “molpdf”, onde o modelo que tinha o menor valor foi considerado como melhor modelo, isto é, o primeiro modelo (**Tabela 5 e 6**). A qualidade dos modelos gerados foi avaliada pelos softwares: PROCHECK, VERIFY3D e WHATIF.

Tabela 4. Moldes selecionados com a estrutura tridimensional da proteína resolvida

Moldes	E-value:	Score	Identidade	Gaps
3wdo	1.9551E-6	51.60	33%	1%
4lds	0.608996	33.49	34%	5%
4ja3	3.12499	30.80	33%	10%

Tabela 5. Modelos gerados pelo Modeller e o score atribuído para a modelagem da proteína codificada pelo gene *floR* em *A. Bestiarium* (gene referência)

Modelos	Molpdf
prAB.B99990001.pdb	22139.34375
prAB.B99990002.pdb	22199.01172
prAB.B99990003.pdb	22301.62695
prAB.B99990004.pdb	22314.52734
prAB.B99990005.pdb	22365.55664

Tabela 6. Modelos gerados pelo Modeller e o score atribuído para a modelagem da proteína codificada pelo gene *floR* de cada haplótipo.

HAPLÓTIPO	MODELOS	MOLPDF
TAA	sqrhtaa.B99990001.pdb	22028.51953
	sqrhtaa.B99990002.pdb	22129.51172
	sqrhtaa.B99990003.pdb	22254.62500
	sqrhtaa.B99990004.pdb	22266.87500
	sqrhtaa.B99990005.pdb	22220.63281
TTA	sqrhtta.B99990001.pdb	22154.04102
	sqrhtta.B99990002.pdb	22077.30273
	sqrhtta.B99990003.pdb	22379.51953
	sqrhtta.B99990004.pdb	22276.83203
	sqrhtta.B99990005.pdb	22115.40430
CTG	sqrhctg.B99990001.pdb	22060.08594
	sqrhctg.B99990002.pdb	22305.33008
	sqrhctg.B99990003.pdb	22209.83789
	sqrhctg.B99990004.pdb	22169.08203
	sqrhctg.B99990005.pdb	22217.62305

Os resultados obtidos no PROCHECK para a proteína referência modelada demonstram no gráfico de Ramachandran que 90,8 % dos resíduos da proteína modelada estão em regiões favoráveis (**Figura 4**). De acordo com Laskowski et al., (1993) a estrutura para ser ideal deve ter mais de 90% dos seus resíduos nas regiões vermelhas, marcada com A, B e L (regiões favoráveis). Os resultados obtidos no VERIFY3D para a proteína referência demonstraram que 69.55% dos

resíduos da proteína modelada obtiveram pontuação média de 3D-1D acima ou igual a 0.2 (**Figura 5**).

Nas análises com o WHATIF a qualidade do empacotamento da proteína referência modelada apresentou valor médio de -1.050 sendo assim, o modelo obtido foi considerado bom. A qualidade é avaliada da seguinte forma: maior que -0,5: ótimo modelo; em -0,5: valor médio para um bom modelo; entre -1,0 e -0,5: ainda um bom modelo; em -1,5: ainda um bom modelo, mas com pequenos erros; em -2,0: modelo considerado pobre; em -3,0: modelo ruim (VRIENDS; SANDER, 1993).

Figura 4. Gráfico de Ramachandran referente a proteína referência com 90,8% dos resíduos da proteína modelada em regiões favoráveis (A, B e L), 8,1% em regiões permitidas (a, b, l, p), 0,9% em regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p), 0,3% em regiões desfavoráveis (branco).

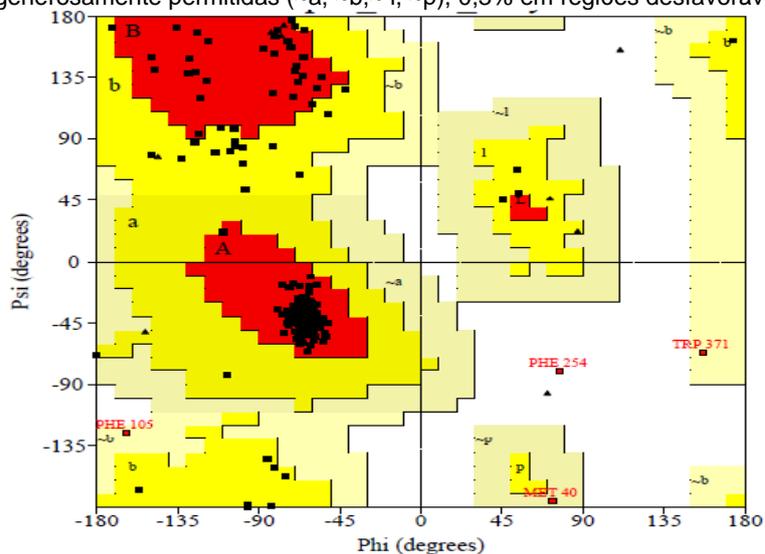
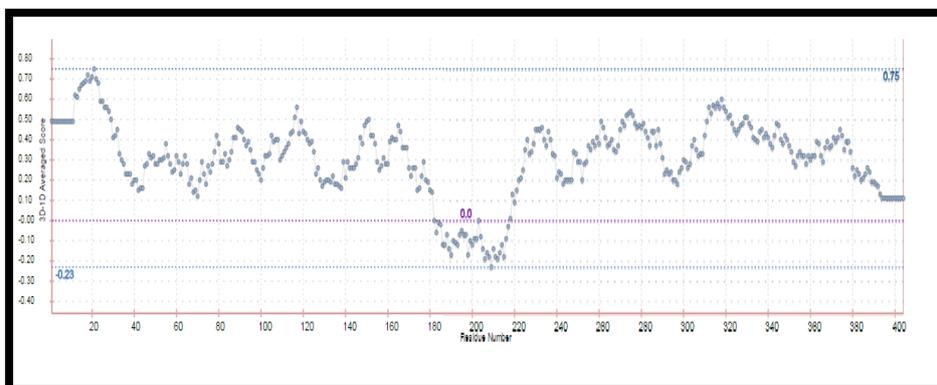
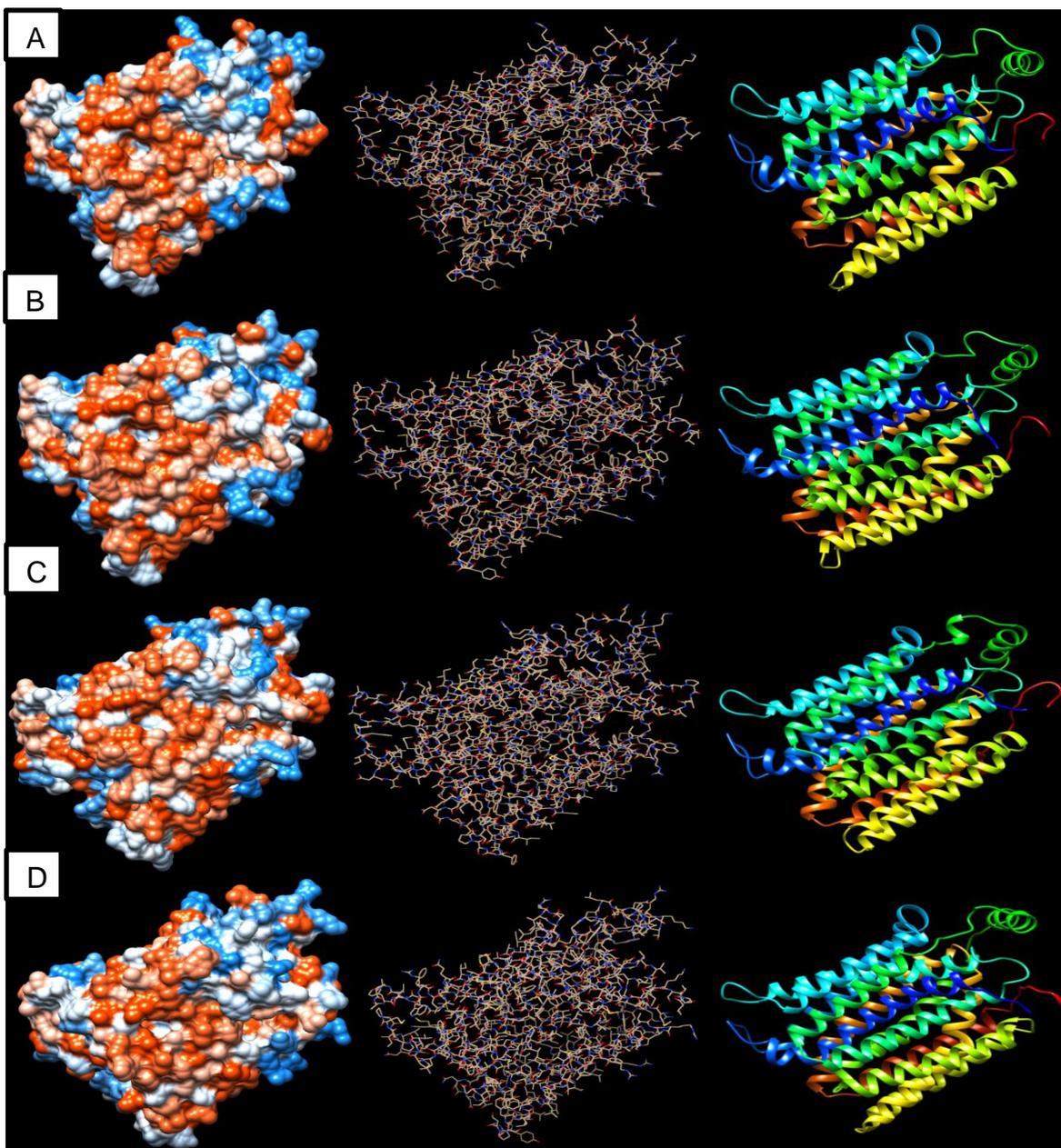


Figura 5. Gráfico gerado pelo programa Verify3D demonstrando a pontuação dos resíduos da proteína modelada referente a proteína referência



A proteína codificada pelo gene *floR*, modelada para *A. Bestiarium* (proteína referência), está representada na **Figura 6 (A)**. Os modelos 3D das proteínas modelada para os três haplótipos TAA, TTA e CTG estão representados na **Figura 6 (B, C e D)** respectivamente (SALI; BLUNDELL, 1993).

Figura 6. Proteína modelada no programa Modeller para *A. Bestiarium* (A), haplótipo TAA (B), TTA (C) e CTG (D). Estrutura 3D, átomos e ribons, respectivamente



Os resultados obtidos no PROCHECK para o haplótipo TAA mostram que o gráfico de Ramachandran demonstra que 92,2 % dos resíduos da proteína modelada estão em regiões favoráveis (Figura 7), para o haplótipo TTA o gráfico demonstra que 91,4 % dos resíduos da proteína modelada estão em regiões favoráveis (Figura 8) e para o haplótipo CTG o gráfico demonstra que 92,2 % dos resíduos da proteína modelada estão em regiões favoráveis (Figura 9). Esses resultados demonstram que a exatidão estereoquímica dos modelos gerados é boa.

Figura 7. Gráfico de Ramachandran referente ao haplótipo TAA com 92,2% dos resíduos da proteína modelada em regiões favoráveis (A, B e L), 6,3% em regiões permitidas (a, b, l, p), 0,6% em regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p), 0,9% em regiões desfavoráveis (branco).

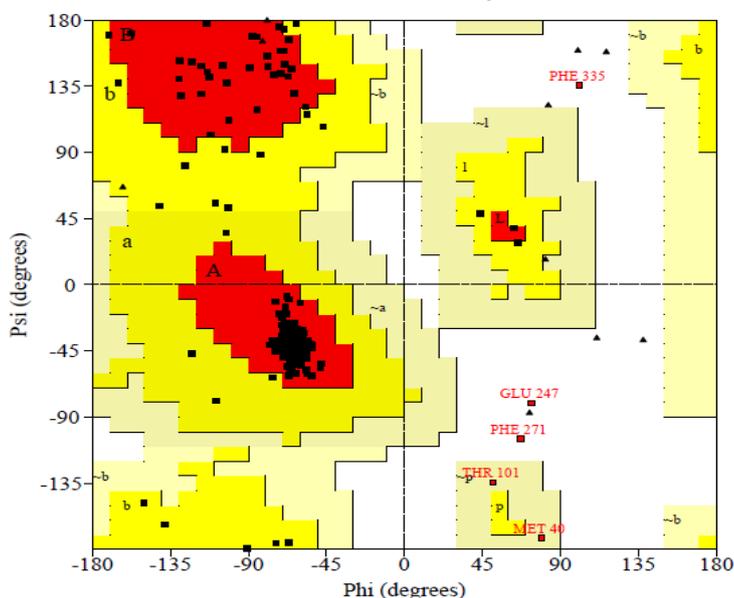


Figura 8. Gráfico de Ramachandran referente ao haplótipo TTA com 91,4% dos resíduos da proteína modelada em regiões favoráveis (A, B e L), 6,9% em regiões permitidas (a, b, l, p), 1,2% em regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p), 0,6% em regiões desfavoráveis (branco).

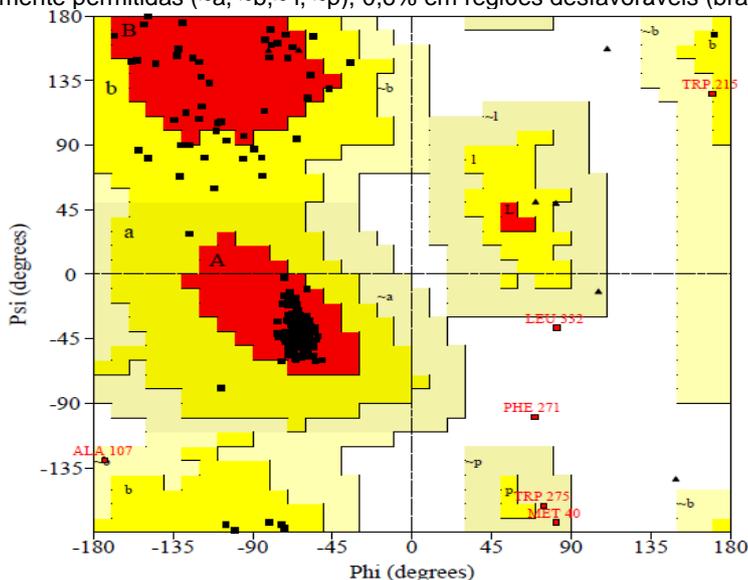
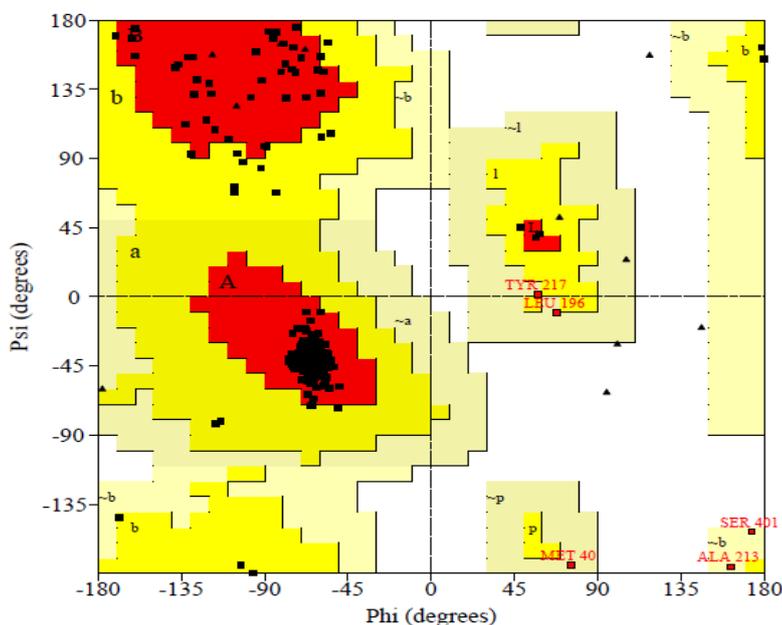


Figura 9. Gráfico de Ramachandran referente ao haplótipo CTG com 92.2% dos resíduos da proteína modelada em regiões favoráveis (A, B e L), 6.4% em regiões permitidas (a, b, l, p), 1.4% em regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p), 0.0% em regiões desfavoráveis (branco).



Os resultados obtidos no VERIFY3D para o haplótipo TAA mostraram que 79.46% dos resíduos da proteína modelada obtiveram pontuação média de 3D-1D acima ou igual a 0.2 (**Figura 10**), para o haplótipo TTA 81.68% dos resíduos da proteína modelada obtiveram pontuação média de 3D-1D acima ou igual a 0.2 (**Figura 11**) e para o haplótipo CTG 80.45% dos resíduos da proteína modelada obtiveram pontuação média de 3D-1D acima ou igual a 0.2 (**Figura 12**). Esses resultados demonstram que esses modelos estão bons em relação à confiabilidade do enovelamento das proteínas, em que 80% dos resíduos devem estar acima ou iguais a 0.2 (BOWIE et al., 1991).

Figura 10. Gráfico gerado pelo programa Verify3D demonstrando a pontuação dos resíduos da proteína modelada referente ao haplótipo TAA

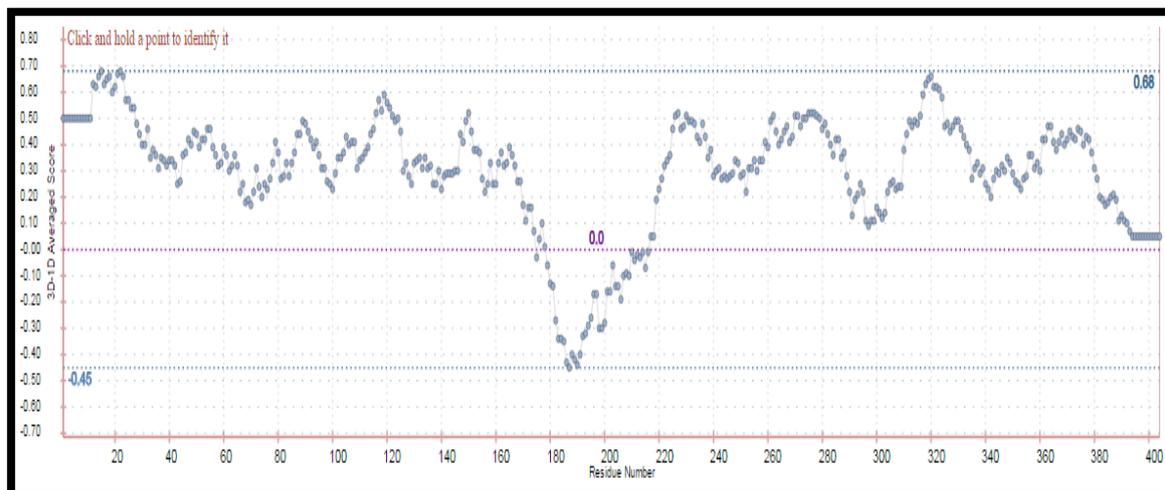


Figura 11. Gráfico gerado pelo programa Verify3D demonstrando a pontuação dos resíduos da proteína modelada referente ao haplótipo TTA

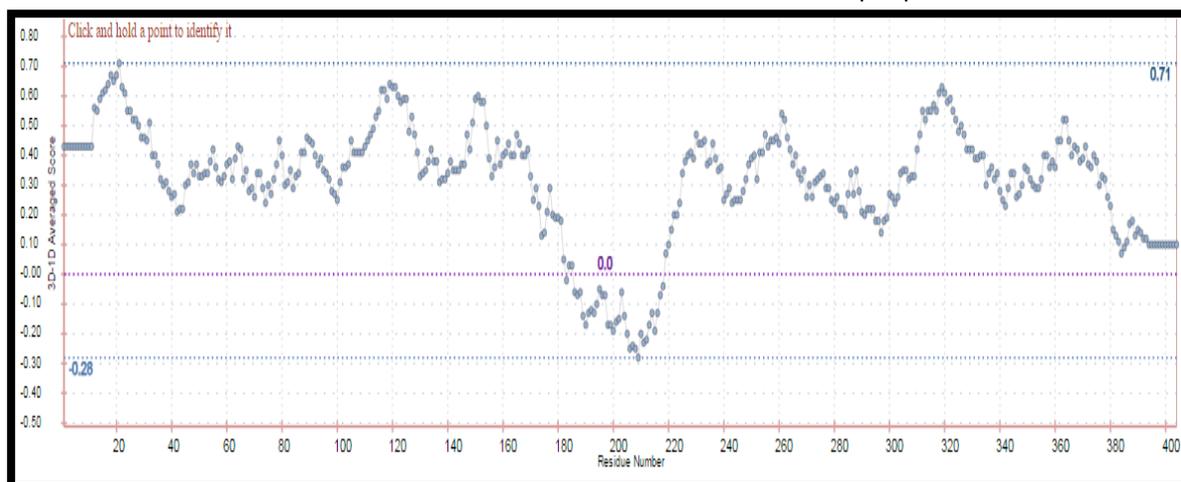
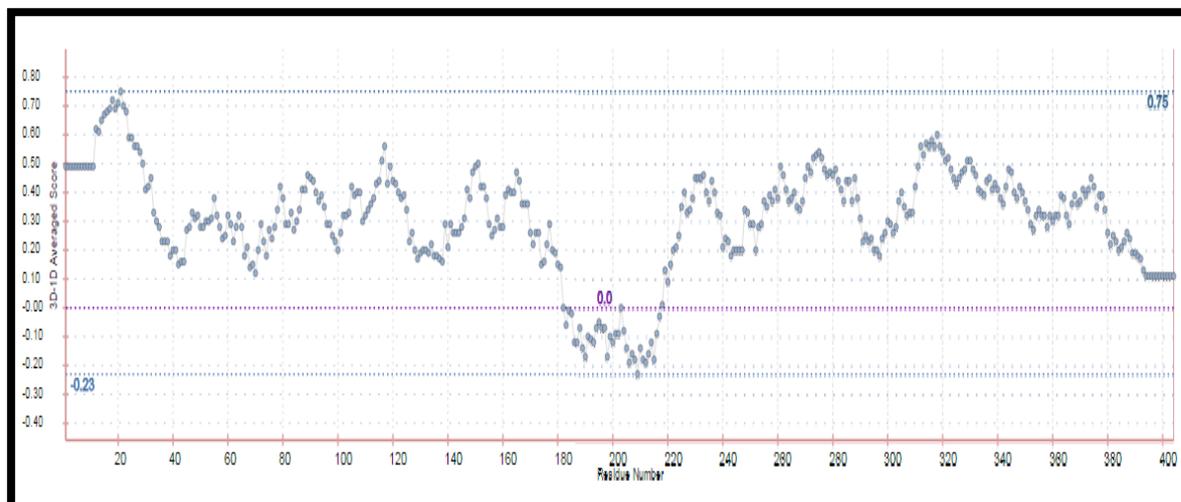


Figura 12. Gráfico gerado pelo programa Verify3D demonstrando a pontuação dos resíduos da proteína modelada referente ao haplótipo CTG



Os resultados obtidos no WHATIF para a qualidade do empacotamento do haplótipo TAA mostraram que o valor médio encontrado foi de -0,994, para o haplótipo TTA o valor médio encontrado foi de -0,968, para o haplótipo CTG o valor médio encontrado foi de -1,061. Esses resultados mostraram que esses modelos são considerados bons.

Os resultados do TM-align para o modelo das proteínas codificadas pelos haplótipos TAA, TTA e CTG demonstraram que essas proteínas possuem praticamente a mesma conformação da proteína referência (valores de TM-score de 0,98414, 0,98557 e 0,98400 para os haplótipos TAA, TTA e CTG, respectivamente) (**Figura 6 B, C e D**). De acordo com Zhang e Skolnick (2005), o TM-score é dado entre 0 e 1, com os melhores alinhamentos apresentando pontuações próximas de 1. Pontuações próximas a 1 são dadas quando no alinhamento as regiões se apresentam ordenadas e pontuações baixas são dadas quando no alinhamento há regiões de desordem (ZHANG; SKOLNICK, 2005). Esses resultados indicam que as mutações encontradas não provocam alterações na estrutura da proteína codificada pelo gene *floR*.

De acordo com Nayeem et al., (2006) a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada que sua sequência de aminoácidos durante o processo evolutivo, e que pequenas mudanças na sequência geralmente provoca sutis modificações na estrutura tridimensional.

No presente estudo, segundo o teste de microdiluição em caldo, os 14 isolados que continham o gene *floR* foram resistentes ao florfenicol e 13 isolados que foram negativos para a presença do gene foram sensíveis no teste (**Anexo 2**). Esses resultados comprovam que nos isolados avaliados o gene *floR* é o responsável pela resistência ao florfenicol e, que os SNPs detectados nesse estudo não afetam a função desse gene, fato que reforça os resultados obtidos pela modelagem das proteínas codificadas pelos diferentes haplótipos detectados. Um estudo realizado por Fernandez-Alarcon et al. (2010) com bacilos gram negativos isolados de peixes mostrou que todos os isolados que continham o gene *floR* eram resistentes ao florfenicol e também apresentavam resistência a múltiplas drogas. Testes de microdiluição em caldo com isolados de *Salmonella*

que tinham o plasmídeo contendo o gene *floR* e mediando resistência ao florfenicol, demonstraram resistência tanto para florfenicol e cloranfenicol (DOUBLET et al, 2004).

O cloranfenicol e alguns derivados como o tianfenicol e azidamfenicol têm sido usados ao longo dos anos na medicina humana (SCHWARZ et al, 2004). A resistência bacteriana mediada pelo gene *floR* ao cloranfenicol, levanta a possibilidade de que esse antimicrobiano poderia ter selecionado anteriormente o gene *floR*, muito antes da introdução do florfenicol na medicina veterinária (DOUBLET et al, 2004).

Vários genes têm sido descritos pela literatura contribuindo de forma combinada para resistência ao cloranfenicol e florfenicol, como *pp-flo*, *CMLA-like*, *floSt*, *flo*, ou *floR*. Esses genes já foram encontrados em diferentes espécies, como: *Salmonella Typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*, etc. Apesar das várias designações, esses genes estão intimamente relacionados mostrando 96-100% de identidade em suas sequências de nucleotídeos e 88-100% de identidade de sequências de aminoácidos (SCHWARZ et al, 2004).

Os genes *pp-flo*, *CMLA-like*, *floSt* e *flo* começaram a ser descritos na literatura depois que se iniciou o uso do cloranfenicol. Após a proibição do uso desse antimicrobiano na medicina veterinária e a substituição pelo florfenicol, que é derivado do cloranfenicol, começaram a surgir relatos da resistência bacteriana através do gene *floR*. O gene *floR* está relacionado diretamente com a resistência ao florfenicol, como comprovado no presente estudo, e já foi descrito em bactérias de diferentes gêneros (SCHWARZ et al, 2004).

No teste com o inibidor de bomba de efluxo (CCCP) na presença do florfenicol, os 3 isolados testados para os três diferentes haplótipos identificados nesse estudo (TTA, TAA e CTG), que eram resistentes ao florfenicol, demonstraram sensibilidade em todas as concentrações utilizadas (**Tabela 7**). Esse resultado pode comprovar que a resistência ao florfenicol está relacionada com a atividade de bombas de efluxo, sendo que na presença do inibidor as bactérias se tornaram sensíveis ao antimicrobiano testado (florfenicol).

Tabela 7. Referente aos 3 haplótipos testados na microdiluição em caldo com presença e ausência do inibidor CCCP.

Isolado	CBM (sem CCCP)	CBM (com CCCP)	Haplótipo
P 1.6	>73,1 µg/mL	<0,0085µg/mL	TAA
35	>2,34 mg/mL	<0,0085µg/mL	CTG
G4	>9,14 µg/mL	<0,0085µg/mL	TTA

De acordo com Du et al. (2004), em seu estudo utilizando o inibidor de bomba de efluxo CCCP, em isolados de *Escherichia coli* que tinham o gene *floR* e eram resistentes ao florfenicol, foi possível observar que houve um aumento rápido e significativo de florfenicol dentro da célula após o uso do CCCP. Esses autores afirmam que a resistência ao florfenicol é devido à presença de bomba de efluxo. Estudos realizados por Kadlec et al. (2007) e Vecchione et al. (2009) utilizando o inibidor de bomba de efluxo Phe-Arg-β-naphthylamide (PAβN) em bactérias resistentes ao florfenicol, foi observado que essa resistência pode ser explicada pela presença de bombas de efluxo. Inibidores de bomba de efluxo vem sendo pesquisados como alternativas terapêuticas em outros micro-organismos como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (HANDZLIK et al., 2013; ASKOURA et al., 2011). Além de representar uma opção terapêutica, os inibidores de bomba de efluxo são muito importantes para detecção deste mecanismo de resistência (VAN BAMBEKE et al., 2010). Produtos naturais têm sido explorados quando a sua capacidade de inibição de bomba de efluxo em micro-organismos. Estudos desta natureza são bastante complexos e necessitam da integração de plataformas de caracterização química, genética e de bioinformática (TEGOS et al., 2011).

No presente estudo, pode ser observado também que, o inibidor de bomba de efluxo não provocou diferença de sensibilidade/resistência ao antimicrobiano florfenicol quando se compara os três haplótipos encontrados nesse estudo. Esse

resultado consolida os resultados do TM-align ao comparar as proteínas modeladas pelos haplótipos TAA, TTA e CTG que demonstrou que essas proteínas possuem praticamente a mesma conformação e também os resultados gerados pelo SIFT e PolyPhen que não demonstraram alteração de função em relação aos SNPs detectados.

6. CONCLUSÕES

Foi possível observar nesse estudo que a resistência ao flofenicol em *Aeromonas* spp. pode ser explicada pela presença do gene *floR*. Os isolados avaliados apresentaram mutações no gene *floR*, mas essas mutações não estão envolvidas com alteração de estrutura e função da proteína codificada por esse gene.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, S.L; CHEUNG, W.K.W; JANDA, J.M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal Of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 6, p. 2348–2357, 2003.
- ABBOTT, S.L; LOURDES, S. S; MICHAEL, C. JR; MICHAEL A. H; JANDA, J. M. Misidentification of Unusual *Aeromonas* Species as Members of the Genus *Vibrio*: a Continuing Problem. **Journal Of Clinical Microbiology**. v. 36, n. 4, p. 1103–1104, 1998.
- ADZHUBEI, I.A; SCHMIDT, S; PESHKIN L; RAMENSKY V. E; GERASIMOVA A; BORK, P; KONDRASHOV, A.S; SUNYAEV, S.R. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nat Methods**. v.7, p.248–249, 2010.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA PESCA E AQUICULTURA. 1st Brazilian Fishery and Aquaculture Yearbook, 2014.
- ARAVENA-ROMAN,M; BEAZ-HIDALGO,R; INGLIS,T.J.J; RILEY,T.V; MARTINEZ-MURCIA, A.J; CHANG, B.J; FIGUERAS, M.J. *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.63, p.2270–2276, 2013.
- ASKOURA, M; MOTTAWEA, W; ABUJAMEL, T; TAHER, I. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **Libyan J Med**. v.6, p. 5870, 2011.
- BAMBEKE, F.V; BALZI, E; TULKENS, P.M. Antibiotic Efflux Pumps. **Biochemical Pharmacology**. v. 60, p. 457–470, 2000.
- BAO, L; CUI, Y. Prediction of the phenotypic effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms using structural and evolutionary Information. **Bioinformatics**. v.21,n. 10, p.2185–2190, 2005.
- BAYM, M; STONE,L. K; KISHONY, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Antibiotic Resistance**. v. 351, p.9, 2016.
- BEAZ-HIDALGO, R; FIGUERAS, M.J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. **Journal of Fish Diseases**. v.36, p.371–388, 2013.
- BLAST – Assembled RefSeq Genomes. 2014. Acesso: 24/06/2014
<www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D. A. Alterações histológicas e comportamentais provocadas pela inoculação de suspensão bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**. v. 31, p. 687-694, 2001.

BOTELHO ,R.G; CHRISTOFOLETTI, C.A; CORREIA, J.E; ANSOAR, Y; OLINDA, R.A.; TORNISIELO, V.L. Genotoxic responses of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to florfenicol and oxytetracycline. *Chemosphere*. v.132, p.206–212, 2015.

BOWIE,J.U; LUTHY, R; EISENBERG, D. A method to identify protein sequence that fold into known tree-dimensional structure. **Science**. v.12, p.164-170, 1991.

BUTAYE, P; CLOECKAERT, A; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 22, p.205-210, 2003.

CABELLO, F.C; Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**. v.8 (7), p.1137–1144, 2006.

CAPRIOTTI, E; ALTMAN, R.B. Improving the prediction of disease-related variants using protein three-dimensional structure. **BMC Bioinformatics**. v.12, p.10, 2011.

CARNAHAN, A. M; CHAKRABORTY, T; FANNING, G. R; VERMA, D; ALI, A; JANDA, J. M; JOSEPH, S. W. *Aeromonas trota* sp. nov., an Ampicillin-Susceptible Species Isolated from Clinical Specimens. **Journal Of Clinical Microbiology**. v. 29, n. 6, p. 1206-1210, 1991.

CARVALHO, M.J; MARTÍNEZ-MURCIA, A; ESTEVES, A. C; CORREIA, A; SAAVEDRA, M.J. Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. **International Journal of Food Microbiology**. v.159, p.230–239, 2012.

CHUA, P; HAR, Z. M; AUSTIN, C.M; YULE, C.M; DYKES, G.A; LEE, S.M; Genome sequencing and annotation of *Aeromonas* sp. HZM. **Genomics Data**. v. 5, p.38–39, 2015.

CIPRIANO, R. C. *Aeromonas hydrophila* and motile Aeromonad septicemias of fish. Washington, D.C.: **Fish and Wildlife Service Division of Fishery Research**. 2001.

CLOECKAERT, A; BAUCHERON, S; FLAUJAC, G; SCHWARZ, S; KEHRENBURG, C; MARTEL, J-L;3 CHASLUS-DANCLA, E. Plasmid-Mediated Florfenicol Resistance Encoded by the *floR* Gene in *Escherichia coli* Isolated from Cattle. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v.44, n. 10, p. 2858–2860, 2000.

CLSI/NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Proposed Guideline. **CLSI/NCCLS Document M45-P**.v. 25 n.26, 2006.

COLWEL, R. R. et al. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 36, n. 3, p. 473-477, 1986.

DALLAIRE-DUFRESNE, S; TANAKA, K.H; TRUDEL, M.V; LAFAILLE, A; CHARETTE, S.J. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. **Veterinary Microbiology**. v. 169, p.1–7, 2014.

DOUBLET, B; CARATTOLI, A; WHICHARD, J.M; WHITE, D.G; BAUCHERON, S; CHASLUS-DANCLA, E; CLOECKAERT, A. Plasmid mediated florfenicol and ceftriaxone resistance encoded by the *floR* and *blaCMY-2* genes in *Salmonella enterica* serovars *Typhimurium* and Newport isolated in the United States. **FEMS Microbiology Letters**. v.233, p.301–305, 2004.

DU, X; XIA, C; SHEN, J; WU, B; SHEN, Z. Characterization of florfenicol resistance among calf pathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 236, p.183-189, 2004.

EWING, B; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**. v.8, p.186-194, 1998.

EWING, B; HILLIER, L; WENDL, M.C; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**. v.8, p.175-185, 1998.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of world fisheries and aquaculture**. p.230, 2012. Acesso: 20/10/2015 <<http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>>

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of world fisheries and aquaculture**. p. 243, 2014. Acesso: 20/10/2015 <<http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>>

FENG, J-B; JIA, X-P; LI, L-D. Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. caureus*) after a single oral administration in freshwater and seawater at 28 °C. **Aquaculture**. v.276, p.29–35, 2008.

FERNÁNDEZ-ALARCO, C. et al. Detection of the *floR* Gene in a Diversity of Florfenicol Resistant Gram-Negative Bacilli from Freshwater Salmon Farms in Chile. **Zoonoses Public Health**. v. 57, p. 181-188, 2010.

FLORFENICOL, VETERINARY-SYSTEMIC. The United States Pharmacopeial Convention. p.6, 2007.

FREDERICKS, D.N.; RELMAN, D.A. Improved Amplification of Microbial DNA from Blood Cultures by Removal of the PCR Inhibitor Sodium Polyanetholesulfonate. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.10, p.2810-2816, 1998.

GALINDO, C. L. et al. Host immune responses to *Aeromonas* virulence factors. **Currente Immunology Reviews**. v.2, p.13-26, 2006.

GASTALHO, S.; SILVA, G.J ; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**. vol. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.

GHATAK, S; AGARWAL R. K, BHILEGAONKAR K.N. Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. By restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. **Letters in Applied Microbiology**, v.44, p.550-554, 2007.

GHENGHESH, K.S; AHMED, S.F; EL-KHALEK, R.A; AL-GENDY, A; KLENA, J. *Aeromonas*-Associated Infections in Developing Countries. **Journal Infect Developing Countries**. v.2(2), p.81-98, 2008.

GORDON, L; CLOECKAERT, A; DOUBLET, B; SCHWARZ, S; BOUJU-ALBERT, A; GANIERE, J-P; BRIS, H; FLECHE-MATE, A; GIRAUD, E. Complete sequence of the floR-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. Journal of Antimicrobial. **Chemotherapy**. v. 62, p. 65-71, 2008.

GRAF, J. Diverse restriction fragment length polymorphism patterns of the pcr-amplified 16s rna genes in *Aeromonas veronii* strains and possible misidentification of *Aeromonas* species. **Journal Of Clinical Microbiology**. v. 37, n. 10, p. 3194–3197, 1999.

GOSWAMI, A. C. Structural modeling and in silico analysis of non-synonymous single nucleotide polymorphisms of human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. **Meta Gene 5**. p162–172, 2015.

GUGLIELMETTI, E; KORHONEN, J.M; HEIKKINEN, J; MORELLI, L; WRIGHT, A.V. Transfer of plasmid-mediated resistance to tetracycline in pathogenic bacteria from fish and aquaculture environments. **FEMS Microbiol Lett**. v.293. p, 28–34, 2009.

HAENEN, O.L.M; EVANS, J.J; BERTHE, F. Bacterial infections from aquatic species: potential for and prevention of contact zoonoses. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. v.32 (2), p.497-507,2013.

HANDZLIK, J; MATYS, A; KIEĆ-KONONOWICZ, K. Recent Advances in Multi-Drug Resistance (MDR) Efflux Pump Inhibitors of Gram-Positive Bacteria *S. aureus*. **Antibiotics**.v. 2, p. 28-45, 2013.

HANNINEN, M-L; OIVANEN, P; VARPU. H-K. *Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater. **International Journal of Food Microbiology**. v. 34, p.17-26, 1997.

HATHA, M; VIVEKANANDHAN, .A.A; JOICE, G.J; CHRISTOL. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. **International Journal of Food Microbiology**. v.98, p.131– 134, 2005.

HEKTOEN,H; BERGE, J.A; HORMAZABAL, V; YNDESTAD, M. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. **Aquaculture**. v. 133, p.175-184, 1995.

HU, M; WANG, N; PAN, Z.H. ; LU, C.P; LIU, Y.J. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China. **Letters in Applied Microbiology**. v. 55, p. 224–233, 2012.

HUANG, X; MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Research**. v.9, p.868-877, 1999.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatísticas da aquicultura divulgadas pelo IBGE. Acesso: 10/03/2016 < www.sidra.ibge.gov.br>

IGBINOSA, I.H; IGUMBOR.E.U.; AGHDASI, F; TOM,M; OKOH, A.I. Emerging *Aeromonas* Species Infections and Their Significance in Public Health. **The Scientific World Journal**. p. 1-13, 2012.

ISONHOOD, J.; DRAKE, M. *Aeromonas* species in foods. Journal of Food Protection Iowa: **International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians**. v.65, n.3, p.575-582, 2002.

JACOBS, L.; CHENIA, Y. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. Isolated from South African aquaculture systems. **International Journal of Food Microbiology**. v. 114, p- 295-306, 2007.

JALAL, S; CIOFU, O; HØIBY, N; GOTOH, N; WRETLIND, B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**.v. 44, p.710–712, 2000.

JANDA, J.M; ABBOTT, S.L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 23, p. 35-73, 2010.

JOSEPH, S.W; CARNAHAN, A. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. **Annual Review of Fish Diseases**.v.4, p. 315-343, 1994.

KADLEC, K; KEHRENBURG, C; SCHWARZ, S. Efflux-mediated resistance to florfenicol and/or chloramphenicol in *Bordetella bronchiseptica*: identification of a novel chloramphenicol exporter. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.59, p.191–196, 2007.

KIMURA, M. A. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v.16, p.111–120, 1980.

KUBITZA, F. Tilápias na mira dos patógenos. **Panorama da aquicultura**. v.18, n.107, p.28- 37, 2008.

KUBTIZA, F. Para onde segue a produção de tilápias no Brasil?. **Panorama da aquicultura**. p.14-25, 2010.

KUBTIZA, F.; KUBTIZA, L. M. M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. 4ª. ed. Jundiaí. p.118, 2004.

LASKOWSKI R.A; MACARTHUR M.W; MOSS D.S, THORNTON J.M.
PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**. v. 26, p. 283–291, 1993.

LEHNINGER, A.L. Lehninger Principios da Bioquímica. 4. Edição, São Paulo. Editora:Savier. p. 1232, 2006.

LARKIN, M. A; BLACKSHIELDS, G; BROWN, N.P; CHENNA, R; MCGETTIGAN P.A; MCWILLIAM, H; VALENTIN, F; WALLACE I.M; WILM, A; LOPEZ, R; THOMPSON, J.D; GIBSON, T.J; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**. v.21, p.2947-8, 2007.

LI, F; WANG, W; ZHU, Z; CHEN, A; DU, P; WANG, R; CHEN, H; HU, Y; LI, J; KAN, B; WANG, D. Distribution, virulence-associated genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolates from diarrheal patients and water, China. **Journal of Infection**. v.70, p.600-608, 2015.

LI, Y; LIU, Y; ZHOU, Z; HUANG, H; REN, Y; ZHANG, Y; LI, G; ZHOU, Z; WANG, L. Complete Genome Sequence of *Aeromonas veronii* Strain B565. **Journal Of Bacteriology**. v.193, n. 13, p.3389–3390, 2011.

LYNCH, A.S. Efflux systems in bacterial pathogens: An opportunity for therapeutic intervention? An industry view. **Biochemical Pharmacology**. v.71, p.949– 956, 2006.

MAPA, Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 42, DE 20 DE DEZEMBRO DE 1999**.

MARTÍNEZ-MURCIA, A.J; FIGUERAS, M.J; SAAVEDRA, M.J; STACKEBRANDT, E. The recently proposed species *Aeromonas sharmans* sp. nov., isolate GPTSA-6T, is not a member of the genus *Aeromonas*. **International Microbiology**. v.10, p.61–64, 2007.

MARTÍNEZ-MURCIA, A.J; SOLER, L; SAAVEDRA, M.J; CHACÓN, M.R; GUARRO, J; STACKEBRANDT, E; FIGUERAS, M. J. Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum*. **International Microbiology**.v. 8, p.259-269, 2005.

MCMAHON, M.A.S; WILSON, I.G. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. **International Journal of Food Microbiology**. v.70, p.155–162, 2001.

MERINO, S. RUBIRES, X; KNGCHEL, S; TOMB, J.M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**. v. 28, p.157-168, 1995.

MIÑANA-GALBIS, D; URBIZU-SERRANO, A; FARFAN, M; FUSTE, M.C; LOREN, J.G. Phylogenetic analysis and identification of *Aeromonas* species based on sequencing of the cpn60 universal target. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.59, p.1976–1983, 2009.

MPA, MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. p. 60, 2011. Acesso: 20/10/2015
<http://www.mpa.gov.br/files/docs/Boletim_MPA_2011_pub.pdf>

MPA, MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. p. 129, 2010.

NAKKEN, S; ALSETH, I; ROGNES, T. Computational prediction of the effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in human dna repair genes. **Neuroscience**. v.145, p.1273–1279, 2007.

NAM, I. Y.; JOH, K. Rapid detection of virulence of *Aeromonas* isolated from a trout by hexaplex-PCR. **Journal of Microbiology**. v.45, n.4, p.297-304, 2007.

NAVINER, M; GORDON, L; GIRAUD, E; DENIS, M; MANGION, C; BRIS, H.L; JEAN- GANIÈRE, P. Antimicrobial resistance of *Aeromonas* spp. isolated from the growth pond to the commercial product in a rainbow trout farm following a flumequine treatment. **Aquaculture**. v.315, p. 236-241, 2011.

NAWAZ, M; SUNG, K; KHAN, S.A; KHAN, A.A; STEELE, R. Biochemical and Molecular Characterization of Tetracycline-Resistant *Aeromonas veronii* Isolates from Catfish. **Applied And Environmental Microbiology**. v. 72, n. 10 p. 6461–6466, 2006.

NAYEEM, A; SITKOFF, D; KRYSTEK, S. A comparative study of available software for high-accuracy homology modeling: From sequence alignments to structural models. **Protein Science**. v.15, p.808–824, 2006.

NG. P. C; HENIKOFF. S. Predicting Deleterious Amino Acid Substitutions. **Genome Research**. v.11(5), p.863-74, 2001.

NG. P. C; HENIKOFF. S. “SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function,” **Nucleic Acids Research**. v. 31, n. 13, p. 3812–3814, 2003.

OCDE-FAO, Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. **Perspectivas Agrícolas**. 2015.

OCDE-FAO. **Perspectivas Agrícolas no Brasil: Desafios da agricultura brasileira 2015-2024**. 2015

PANDIYAN, P; BALARAMAN, D; THIRUNAVUKKARASU, R; GEORGE, E.G.J; SUBARAMANIYAN, K; MANIKKAM, S; SADAYAPPAN, B. Probiotics in aquaculture. **Drug invention today**. v. 5, p.55-59, 2013.

PAO, S.S; PAULSEN,I.T; SAIER, M.J; Major Facilitator Superfamily. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**. v. 62, n. 1 p.1–34, 1998.

PARK, B-K; LIM, J-H; KIM, M-S; HWANG, W.H; YUN, H-I. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in dogs. **Research in Veterinary Science**. v. 84, p.85–89, 2008.

PARKER,J.L; SHAW, J.G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**. v.62, p.109-118, 2011.

PERBERTON, J.M; KIDD, S.P; SCHMIDT, R; Secreted enzymes of *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**. v.152, p.1-10, 1997.

PEZZA, L; RÍOS, A; NOZAL, L; ARCE, L; VALCÁRCEL, M. Determinação Simultânea de Resíduos de Cloranfenicol, Tianfenicol e Florfenicol em Leite Bovino por Cromatografia Eletrocínética Micelar. **Quim. Nova**. v. 29, n. 5, p.926-931, 2006.

PIOTROWSKA, M; POPOWSKA, M. The prevalence of antibiotic resistance genes among *Aeromonas* species in aquatic environments. **Ann Microbiol**. DOI 10.1007/s13213-014-0911-2, 2014.

POULIQUEN, H. et al. Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions. **Aquaculture**. v. 262, p.23-28, 2007.

QUINN, P. J; CARTER, M.E; MARKEY, B; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Medicine**. London. p. 648, 1994.

ROSSI, G.A.M. Importância da Aquicultura na Saúde Pública / Importance of Aquaculture in Public Health. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 10, n. 2 e 3, p. 16–21, 2012.

SÁ, M.C.A. et al. Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. **Genetics and Molecular Biology**. v.36(2), p.265-268, 2013.

SAAVEDRA, M. J;. FIGUERAS, M. J; MARTINEZ-MURCIA, A. J. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.56, p.2481–2487, 2006.

SAITOU, N; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**. v.4, p.406–425, 1987.

SALI, A ; BLUNDELL, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* v.234, p.779-815, 1993.

SCHERING-PLOUGH ANIMAL HEALTH. **Aquaflor. Technical Monograph for catfish health professionals**, p.36. Acesso: 20/10/15 < http://www.aquaflor-usa.com/pdfs/Catfish_Brochure.pdf >

SCHERING-PLOUGH. **Aquaflor-florfenicol. Boletim técnico**. acesso 20/10/15 <<http://www.aquasem.com.br/images/Boletim%20T%C3%A9cnico%20Aquaflor.pdf>>

SCHWARZ, S. et al. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiol. Rev.** v.28, p 519–542, 2004.

SPINOSA, H.S; GÓRNIK, S.L; BERNARDI, M.M. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 5ª edição, p. 809, 2011.

SESHADRI, R; JOSEPH, S.W; CHOPRA, A.K; SHA, J; SHAW, J; GRAF, J; HAFT, D; WU, M; REN, Q; ROSOVITZ, M. J; MADUPU, R; TALLON, L; KIM, M; JIN, S; VUONG, H; STINE, O.C; ALI, A; HORNEMAN, A.J; HEIDELBERG, J.F. Genome Sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: Jack of All Trades. **Journal Of Bacteriology**. v.188, n. 232006, p. 8272–8282, 2006.

SUN, W-X; ZHAO, H-Y; SHAN, Q; ZHU, S; ZENG, D-P; LIU, Z-C. Tissue distribution and elimination of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus cuvieri*) after a single dose intramuscular or oral administration. **Aquaculture**. v.309, p.82–85, 2010.

TACÃO, M; MOURA, A; ALVES, A; HENRIQUES, I; SAAVEDRA, M.J; CORREIA, A. Evaluation of 16S rDNA- and gyrB-DGGE for typing members of the genus *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**. v.246, p.11–18, 2005.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**. v.28, p.2731-2739, 2011.

TEGOS, G. P; HAYNES, M; STROUSE, J. J; KHAN, M. MD. T; BOLOGA, C. G; OPREA, T. I; SKLAR, L. A. Microbial Efflux Pump Inhibition: Tactics and Strategies. **Curr Pharm Des**. v.17(13), p. 1291–1302, 2011.

TENG, S; MADEJ, T; PANCHENKO, A; ALEXOV, E. Modeling Effects of Human Single Nucleotide Polymorphisms on Protein-Protein Interactions. **Biophysical Journal**. v.96, p.2178–2188, 2009.

TORANZO, A.E; MAGARINOS, B; ROMALDE, J.L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. **Aquaculture**. v.246, p.37– 61, 2005.

TRABULSI, L. R; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, p.718. 2004.

VAN BAMBEKE, F; PAGÈS, J.M; LEE, V.J. Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibacterial Therapy and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux. **Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery**. v.1, p.138-175, 2010.

VERNER-JEFFREYS, D.W; WELCH, T.J; SCHWARZ, T; POND, M,J; WOODWARD, M.J; HAIG, S.J;. RIMMER, G.S.E; ROBERTS, E; MORRISON, V; BAKER-AUSTIN, C. High Prevalence of Multidrug-Tolerant Bacteria and Associated Antimicrobial Resistance Genes Isolated from Ornamental Fish and Their Carriage Water. **Ornamental Fish AMR Resistance**. v.4, p.9, 2009.

VECCHIONE, J. J; ALEXANDER, B. JR; SELLO, J. K. Two Distinct Major Facilitator Superfamily Drug Efflux Pumps Mediate Chloramphenicol Resistance in *Streptomyces coelicolor*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v. 53, n. 11, p. 4673–4677 , 2009.

VOGWILL, T; MACLEAN, C. The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. **Evolutionary Applications**. v.8, p.284–295, 2015.

VRIENDS,G; SANDER, C; Quality control of protein models: Directional atomic contact analysis **Journal of Applied Crystallography**. v.26, p.47-60, 1993.

WANG, H; DZINK-FOX, J. L. ; CHEN, M; LEVY, S. B. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, p.1515–1521, 2001.

WEIGEL, L. M; ANDERSON, G. J. ; FACKLAM, R. R. ; TENOVER, F. C. Genetic analyses of mutations contributing to fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45, p.3517–3523, 2001.

WELCH, T.J; EVENHUIS, J; WHITE, D.G; MCDERMOTT, P.F; HARBOTTLE, H; MILLER, R.A; GRIFFIN, M; WISE, D. *IncA/C* Plasmid-Mediated Florfenicol Resistance in the Catfish Pathogen *Edwardsiella ictaluri*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. p. 845–846, 2009.

YANEZ, M. A; CATALAN, V; APRAIZ, D; FIGUERAS, M. J; MARTINEZ-MURCIA, A. J. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.53, p.875–883, 2003.

YOUSR, A.H; NAPIS, S; RUSUL, G.R.A; SON, R. Detection of Aerolysin and Hemolysin Genes in *Aeromonas* spp. Isolated from Environmental and Shellfish

Sources by Polymerase Chain Reaction. **ASEAN Food Journal**.v. 14, n.2, p. 115-122, 2007.

ZHANG, Y; SKOLNICK, J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TMscore. **Nucleic Acids Res.** v.33(7), p. 2302-9, 2005.

Anexo 1

Anexo 1. imagem do gel de agarose a 1,5% com os resultados referentes a presença do gene *floR*

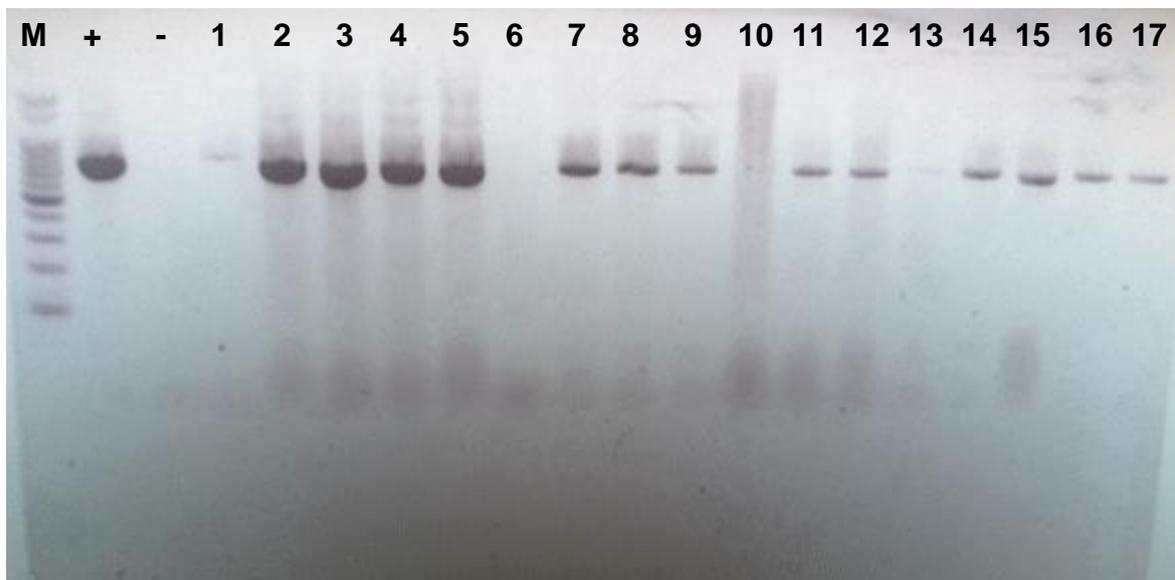


Figura. Eletroforese de amostras amplificadas com o primer do gene *floR* (803 pares de bases). A coluna M apresenta um marcador de peso molecular de 100 pb. As colunas de números 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16 e 17 apresentam amostras com resultados positivos para a presença do gene *floR* e as colunas 6, 10 e 13 negativas. A coluna (+) apresenta o controle positivo da reação e a coluna (-) o controle negativo.

Anexo 2

Anexo 2. Tabela referente aos isolados com presença ou ausência do gene *floR* e concentração bactericida mínima. Isolados com CBM $\geq 8\mu\text{g/mL}$ são considerados resistentes ao antibiótico florfenicol (CLSI, 2006)

Isolado	Gene <i>floR</i>	CBM
11	Positivo	>36,56 $\mu\text{g/mL}$
14	Positivo	>18.2 $\mu\text{g/mL}$
15	Positivo	>18,2 $\mu\text{g/mL}$
22	Positivo	>9,14 $\mu\text{g/mL}$
35	Positivo	>2,34 mg/mL
46	Negativo	>2,28 $\mu\text{g/mL}$
54	Negativo	>1,14 $\mu\text{g/mL}$
60	Positivo	>585 $\mu\text{g/mL}$
72B	Negativo	>4,57 $\mu\text{g/mL}$
74	Positivo	>2,34 mg/mL
A10	Positivo	>585 $\mu\text{g/mL}$
A14	Negativo	>2,28 $\mu\text{g/mL}$
G1	Negativo	>2,28 $\mu\text{g/mL}$
G4	Positivo	>9,14 $\mu\text{g/mL}$
G6	Negativo	>1,14 $\mu\text{g/mL}$
G18	Negativo	>1,14 $\mu\text{g/mL}$
G19	Negativo	>1,14 $\mu\text{g/mL}$
G31	Negativo	>4,57 $\mu\text{g/mL}$
G32	Negativo	>4,57 $\mu\text{g/mL}$
G33	Negativo	>0,57 $\mu\text{g/mL}$
G34	Negativo	>2,28 $\mu\text{g/mL}$
G36	Positivo	>73,1 $\mu\text{g/mL}$
G38	Positivo	>292 $\mu\text{g/mL}$
P1.6	Positivo	>73,1 $\mu\text{g/mL}$
P2.2	Positivo	>292 $\mu\text{g/mL}$
P3.1	Negativo	>0,285 $\mu\text{g/mL}$
P4.2	Positivo	>585 $\mu\text{g/mL}$