



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NATÁLIA AMOROSO FERRARI

PRIMEIRO RELATO DE *Edwardsiella piscicida* EM PINTADO  
(*Pseudoplatystoma corruscans*) NO BRASIL:  
CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA

---

Londrina  
2023

NATÁLIA AMOROSO FERRARI

PRIMEIRO RELATO DE *Edwardsiella piscicida* EM PINTADO  
(*Pseudoplatystoma corruscans*) NO BRASIL:  
CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira

Londrina  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F375p Ferrari, Natália Amoroso.  
Primeiro relato de Edwardsiella piscicida em pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) no Brasil: : Caracterização genômica / Natália Amoroso Ferrari. - Londrina, 2023.  
54 f.

Orientador: Ulisses de Padua Pereira.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2023.  
Inclui bibliografia.

1. Bioinformática - Tese. 2. Edwardsiellase - Tese. 3. Filogenômica - Tese. 4. Peixes - Tese. I. Pereira, Ulisses de Padua . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

NATÁLIA AMOROSO FERRARI

PRIMEIRO RELATO DE *Edwardsiella piscicida* EM PINTADO  
(*Pseudoplatystoma corruscans*) NO BRASIL:  
CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

---

Orientador: Prof. Dr. Ulisses de Pádua  
Pereira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira  
Júnior  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profª Drª Elis Lorenzetti  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2023

Dedico este trabalho ao meu amigo Henrique Momo Ziemniczak (*in memoriam*), que sempre esteve comigo e compartilhou de todas as lutas e conquistas desta jornada enquanto esteve aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Ulisses, meu orientador e amigo, que acompanhou toda a minha trajetória acadêmica, desde a graduação, e me ofereceu a oportunidade de devolver à sociedade soluções e questionamentos através da pesquisa. Também agradeço por caminhar comigo, pelos conselhos, incentivos e até mesmo as broncas para meu desenvolvimento pessoal e profissional. O senhor é muito especial!

Aos Professores Nelson, Elis, Admilton e Eloiza, que são também parte importante da minha formação. A missão de ser professor vai muito além de ensinar. Encontrar pessoas como vocês nos encoraja a persistir na caminhada acadêmica, que não é fácil, mas que é gratificante para aqueles que entendem a sua essência. Muito obrigada por aceitarem fazer parte de mais esta etapa.

Aos meus amigos do LABBEP e da vida, sem vocês isso seria muito mais difícil, para não dizer impossível em alguns momentos. Em especial à Raffaella, João, Lucimara e Hamilton.

A Deus e a minha família, me faltam palavras. Obrigada por serem tudo, em todos os momentos. Cada um de vocês é essencial na minha vida. Só nós sabemos a dor e a alegria de ser quem somos.

À CAPES pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa no período da pesquisa e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela oportunidade de realizar o mestrado.

**“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” (Madre Teresa de Calcutá)**

FERRARI, Natália Amoroso. **Primeiro relato de *Edwardsiella piscicida* em pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) no Brasil: caracterização genômica.** 2023. 54 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

## RESUMO

Uma cepa diferente de *Edwardsiella piscicida* foi descrita pela primeira vez na América Latina, Sul do Brasil. Sabe-se que esta espécie é responsável por muitos surtos, acometendo principalmente bagres, em países como os Estados Unidos, mas ainda não se sabe quão difundida está na piscicultura do Brasil, e qual seu potencial impacto para os peixes nativos e de cultivo. Desta forma, objetivo do primeiro artigo foi sequenciar o genoma completo da cepa BEP80 isolada de pintados (*Pseudoplatystoma corruscans*), como passo inicial para a comparação com as demais cepas desta espécie circulantes no mundo. Para isso, o DNA foi extraído e o genoma foi sequenciado através da plataforma *Illumina HiSeq 2500*. As anotações foram feitas através do *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP) e a busca por genes adquiridos de resistência a antimicrobianos e plasmídeos utilizando os softwares ResFinder e PlasmidFinder foi realizada. Não foram encontrados plasmídeos ou genes de resistência, no entanto, a cepa demonstrou ser multirresistente no teste fenotípico com resistência às classes: aminoglicosídeos, polipeptídios, lincosamidas, sulfonamidas e tetraciclinas. Os objetivos do segundo artigo foram verificar a susceptibilidade de pintados (*Pseudoplatystoma corruscans*) e tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) à cepa BEP80, analisar os genes de virulência envolvidos na sua patogenicidade e realizar uma comparação entre as cepas isoladas em diferentes países através de análise filogenômica. Para isso, seis juvenis das espécies a cima citadas foram desafiados experimentalmente pela via intraperitoneal (IP), na dose de 0,1mL de inóculo na densidade de  $10^{11}$  UFC/mL. Houve mortalidade de 100% dos pintados e tilápias do Nilo após 24 e 48h do desafio, respectivamente. Também foi realizada análise de ilhas genômicas, com foco nas ilhas de patogenicidade, a fim de pesquisar genes envolvidos com fatores de virulência. Foram identificadas 37 ilhas genômicas, sendo 15 patogênicas, nove de resistência, nove de simbiose e quatro metabólicas. Sistemas de secreção do tipo III e VI, reguladores gênicos, proteases, proteínas relacionadas a adesão e colonização do hospedeiro e a resistência ao estresse ambiental foram encontradas. A análise filogenética demonstrou 96% de similaridade com cepas isoladas de bagre-americano (*Ictalurus punctatus*) no Mississippi. Dessa forma, é possível concluir que a cepa de *Edwardsiella piscicida* isolada no Brasil quando comparada as demais cepas disponíveis nos bancos de dados apresenta diferenças na constituição de seu genoma. Além disso, é patogênica e altamente virulenta, tanto para pintados quanto para tilápias do Nilo, demonstrando um potencial para transmissão interespecíes e apresenta multirresistência a cinco classes de antimicrobianos.

**Palavras-chave:** Antimicrobianos. Edwardsielose. Filogenômica. Ilhas de patogenicidade. Transmissão interespecíes.

FERRARI, Natália Amoroso. **First report of *Edwardsiella piscicida* in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) in Brazil: genomic characterization.** 2023. 54 p. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – State University of Londrina, Londrina, 2023.

## ABSTRACT

A different strain of *Edwardsiella piscicida* was first described in Latin America, southern Brazil. It is known that this species is responsible for many outbreaks, mainly affecting pintado, in countries like the United States, but it is still unknown how widespread it is in fish farming in Brazil, and what its potential impact is on native and farmed fish. Thus, the objective of the first article was to sequence the complete genome of the strain BEP80 isolated from the pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), as an initial step for the comparison with the other strains of this species circulating in the world. For this, DNA was extracted, and the genome was sequenced using the Illumina HiSeq 2500 platform. The annotations were made using the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) and a search was carried out for acquired antimicrobial resistance genes and plasmids using the ResFinder and PlasmidFinder. No plasmids or resistance genes were found, however, the strain proved to be multiresistant in the phenotypic test with resistance to classes: aminoglycosides, polypeptides, lincosamides, sulfonamides and tetracyclines. The objectives of the second article were to verify the susceptibility of pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to the BEP80 strain, to analyze the virulence genes involved in its pathogenicity and to carry out a comparison between the strains isolated in different countries through phylogenomic analysis. For this, juveniles of the species mentioned above were experimentally challenged by the intraperitoneal route, at a dose of 0.1mL of inoculum at a density of  $10^{12}$  CFU/mL. There was 100% of Nile tilapia and pintado mortality after 24 and 48 hours of challenge, respectively. Analysis of genomic islands was also carried out, focusing on pathogenicity islands, to search for genes involved with virulence factors. Thirty-seven genomic islands were identified, of which 15 were pathogenic, nine resistant, nine symbiotics and four metabolic. Type III and VI secretion systems, gene regulators, proteases, proteins related to host adhesion and colonization and resistance to environmental stress were found. Phylogenetic analysis showed 96% similarity with strains isolated from American catfish (*Ictalurus punctatus*) in Mississippi. Thus, it is possible to conclude that the strain of *Edwardsiella piscicida* isolated in Brazil, when compared to the other strains available in the databases, presents differences in the constitution of its genome. In addition, it is pathogenic and highly virulent, both for pintado and for Nile tilapia, demonstrating a potential for interspecies transmission and presenting multidrug resistance to five classes of antimicrobials.

**Keywords:** Antimicrobials. Edwardsielosis. Interspecies transmission. Phylogeny. Pathogenicity islands.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
2.1	AQUICULTURA.....	11
2.1.1	<i>Tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus)</i> .....	12
2.1.2	<i>Pintado (Pseudoplatystoma corruscans)</i> .....	12
2.2	EDWARDSIELOSE .....	13
2.2.1	<i>Espécies e hospedeiros</i> .....	13
2.2.2	<i>Sinais clínicos</i> .....	14
2.2.3	<i>Diagnóstico</i> .....	14
2.2.4	<i>Tratamento</i> .....	15
2.2.5	<i>Controle e profilaxia</i> .....	15
2.3	<i>EDWARDSIELLA PISCICIDA</i> – PATOGENIA E FATORES DE VIRULÊNCIA.....	16
2.4	RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS NA AQUICULTURA .....	19
2.5	SEQUENCIAMENTO ILLUMINA .....	20
2.6	ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.....	20
2.6.1	<i>PlasmidFinder</i> .....	21
2.6.2	<i>ResFinder</i> .....	21
2.6.3	<i>Ilhas genômicas</i> .....	22
2.7	ANÁLISE FILOGENÉTICA .....	22
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
5.1	OBJETIVO GERAL.....	32
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>6</b>	<b>ARTIGO A</b> .....	<b>33</b>
	<b>ARTIGO B (de acordo com as normas da revista "Journal of Fish Diseases):</b> <b>Emergence of Edwardsiella piscicida isolated from pintado (<i>Pseudoplatystoma</i></b> <b><i>corruscans</i>) in Brazil: resistance profile, virulence factors, and phylogenomic</b> <b>analysis .....</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é um dos setores com maior crescimento em todo o mundo nos últimos anos. Graças às técnicas de intensificação e o desenvolvimento de novas tecnologias, foi possível observar um aumento de 2,7% na produção de peixes em 2020 atingindo o recorde de 87,5 milhões de toneladas (FAO, 2022).

Diversos fatores como má qualidade da água, falhas no manejo sanitário e altas densidades animais podem favorecer o surgimento de doenças infecciosas, principalmente as de etiologia bacteriana. Além das doenças clássicas conhecidas nas pisciculturas, surgiram outros patógenos emergentes, como *Edwardsiella* spp. e *Lactococcus* spp., que trouxeram a necessidade de estudar essas novas enfermidades (DE PADUA; FIGUEIREDO, 2022).

A Edwardsiellose se destaca por causar alterações gastrointestinais e septicemia em peixes, répteis, anfíbios e humanos (LEUNG *et al.*, 2019). Embora existam cinco espécies pertencentes ao gênero, este trabalho descreve uma cepa de *E. piscicida*, isolada de um surto com mortalidade em pintados, no Brasil. Cepas desta espécie foram relatadas anteriormente causando infecções em *Micropterus salmoides*, *Coregonus lavaretus*, *Taeniura meyeni*, *Lates calcarifer* e mais de 20 espécies marinhas (GRIFFIN *et al.*, 2019).

Além de seu potencial zoonótico, o fato de *E. piscicida* ter sido descrita infectando diversas espécies de peixes é de grande relevância (GRIFFIN *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2022; SHAO *et al.*, 2015). Espécies exóticas, como a tilápia do Nilo, ou nativas, como o pintado, por exemplo, podem transmitir o patógeno entre e interespecies e causar grandes danos ecológicos e ambientais para diversas populações não adaptadas em diferentes nichos. Isto já foi demonstrado para outras espécies de *Edwardsiella* spp., como *E. ictaluri* (DA COSTA *et al.*, 2021a) e *E. anguillarum* (dados não publicados).

Outro fator importante está relacionado com a resistência a antimicrobianos. Bactérias presentes em ambientes aquáticos, como *E. piscicida*, estão sob constante pressão seletiva, seja pelos tratamentos profiláticos e terapêuticos realizados nas unidades de criação ou pela eliminação residual destes fármacos no meio ambiente que contaminam a água. Dessa forma, podem carregar genes de resistência, facilmente transmitidos a outras bactérias (LEUNG *et al.*, 2019).

Embora haja alguns estudos que relatem infecções por este patógeno

em diferentes espécies e caracterizem alguns fatores de virulência, os mecanismos envolvidos na patogenia da doença ainda não foram completamente elucidados (LEUNG *et al.*, 2019). Também faltam informações e análises genômicas que comparem a semelhança entre as espécies de *Edwardsiella* spp. ou até mesmo entre as cepas de uma única espécie, como *E. piscicida*.

Nos últimos anos, aliada às metodologias convencionais para o estudo de patógenos e sua relação com os hospedeiros, a diminuição dos custos popularizou os sequenciamentos e gerou um grande aumento no número de dados disponíveis nos bancos de genomas. Isso permitiu o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática capazes de utilizar a informática para produzir dados de interpretação biológica (VINET; ZHEDANOV, 2011). Atualmente existem 24 genomas de *E. piscicida* disponíveis no banco de dados *GenBank*. A grande maioria destes é proveniente de cepas isoladas nos Estados Unidos, Japão e Coreia do Sul. Em relação aos hospedeiros, a principal espécie de peixe relatada foi o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) com 10 dos 24 genomas, seguida pelo abalote japonês (*Olive flounder*), em 5 genomas.

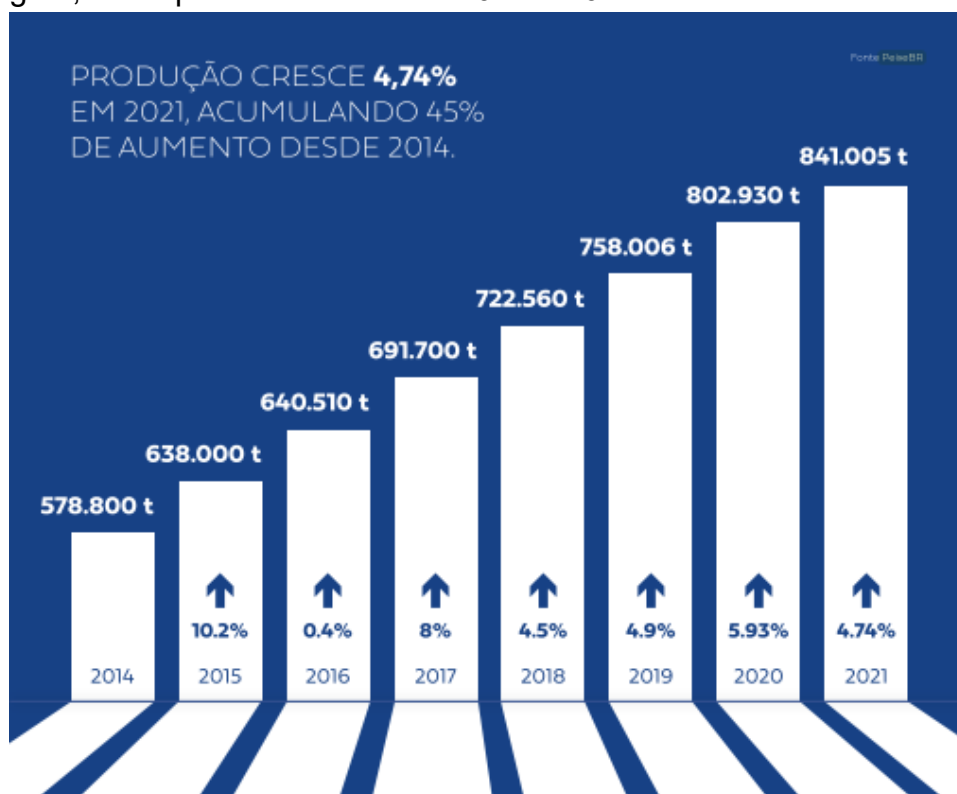
Com isso, este trabalho buscou primeiramente validar a patogenicidade da cepa de *Edwardsiella piscicida* isolada de pintado no Brasil por meio do Postulado de Koch, e avaliar sua capacidade de infectar tilápias do Nilo. Além disso, foi realizado o sequenciamento completo do genoma com intuito de compará-lo por meio de análise filogenômica com as demais cepas da mesma espécie disponíveis no *GenBank*, além de pesquisar genes de resistência e fatores de virulência. Adicionalmente, foram realizados testes fenotípicos de suscetibilidade a antimicrobianos para determinar seu perfil de resistência.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 AQUICULTURA

A aquicultura pode ser definida como a reprodução e crescimento de organismos aquáticos, desde plantas, moluscos e crustáceos, até peixes, anfíbios e répteis, em ambiente controlado ou semicontrolado (VILLARIM DE SIQUEIRA, 2017). Um de seus ramos é a piscicultura: criação racional de peixes, seja para produção de carne, alevinagem ou fins ornamentais (SILVA, 2021). No Brasil, é a atividade de produção animal com maior crescimento, acumulando 45% da produtividade nos últimos oito anos. Em 2021, foram despescadas 841 mil ton (toneladas) de peixes, e o setor movimentou R\$8 bilhões, além de gerar mais de 3 milhões de empregos diretos e indiretos (PEIXE BR, 2022). Na Figura 1 é possível observar o crescimento acumulado e o aumento da produção de tilápias entre os anos de 2014 e 2021.

**Figura 1** – Produção anual, em toneladas, e crescimento acumulado, em porcentagem, de tilápias no Brasil entre 2014 e 2021



### 2.1.1 Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia do Nilo é uma espécie africana da família *Ciclidae*, introduzida no Brasil em 1971, com a importação de exemplares vindos da Costa do Marfim para a Estação de Piscicultura do DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra as Secas) do Ceará. Posteriormente, novas linhagens foram trazidas, como a Chitralada ou Tailandesa e a *Genetically Improved Farmed Tilapia* (RIBEIRO; VARGAS; DE OLIVEIRA, 2016).

Apesar de ser uma espécie conhecida por ter grande resistência e rusticidade, de fácil cultivo, bem adaptada ao clima tropical (PINHEIRO, 2019), há grandes expectativas quanto aos possíveis avanços vindos do melhoramento genético das linhagens para o aprimoramento, não só dos parâmetros zootécnicos, mas também na resistência aos patógenos que ainda causam grandes prejuízos ao setor (JOSHI *et al.*, 2021).

Atualmente, a tilápia está amplamente difundida no Brasil e representa 63,5% (534.005 toneladas) dos peixes de cultivo, liderando a produção nacional. Neste cenário, o país é o quarto maior produtor mundial, atrás apenas da China, Indonésia e Egito. Levando em consideração os principais países produtores, é o peixe de cultivo mais produzido no mundo, seguido pelo pangásio (*Pangasianodon hypophthalmus*) e salmão (*Salmo salar*). A região sul do Brasil é a maior produtora (43,4%), com destaque para o Paraná, seguida da região sudeste (27%), Nordeste (18%) e Centro-Oeste (11,5%) (PEIXE BR, 2022).

### 2.1.2 Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*)

O pintado é um peixe nativo no território brasileiro, da família *Pimelodidae*, que habita as bacias dos rios São Francisco, Paraná, Paraguai e Uruguai. Alguns exemplares dessa família se destacam pelo seu porte e qualidade de carne, que é muito apreciada. O cultivo dessas espécies e seus híbridos é muito importante para reduzir a sobrepesca dos animais de vida livre (MORO *et al.*, 2006).

Quanto a sua reprodução, o pintado realiza migração ascendente para desovar nos cursos superiores dos rios (GODINHO; KYNARD; GODINHO, 2007). É uma espécie de hábito alimentar carnívoro, que apresenta uma dieta bastante diversificada (BOZZA; HAHN, 2010). Seu habitat são áreas profundas e de

remanso nos grandes rios, mas também reservatórios. É muito importante ressaltar que a espécie não consegue completar seu ciclo de vida em áreas represadas, principalmente áreas em cascata (MARIA; CASTRO; ORSI, 2022). Outros fatores como a hibridização e a pesca predatória contribuíram para a diminuição das populações de pintados, que foram incluídos na lista de espécies da fauna do Brasil ameaçadas de extinção, na categoria “vulneráveis” (PORTARIA MMA Nº 148, DE 7 DE JUNHO DE 2022).

Desta forma, é necessário que haja um monitoramento intensivo por parte dos órgãos competentes e um esforço da comunidade científica para contribuir com a preservação, sanidade e bem-estar desta espécie.

## 2.2 EDWARDSIELOSE

### 2.2.1 Espécies e hospedeiros

As bactérias do gênero *Edwardsiella* spp pertencem à família *Hafniaceae*, apresentam-se na forma de bacilos GRAM-negativos e são patógenos intracelulares facultativos. Este gênero surgiu na década de 1960 com isolados de humanos e animais e, até 2012, três espécies compunham o gênero.

**Tabela 1** – Relação espécies x hospedeiro

<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro</b>
<i>E. tarda</i>	Mamíferos, répteis, peixes
<i>E. hoshinae</i>	Répteis e aves aquáticas
<i>E. ictaluri</i>	Peixes <i>Siluriformes</i>
<i>E. piscicida</i>	Diversas espécies de peixes
<i>E. anguillarum</i>	<i>Synbranchiformes</i> e peixes

**Fonte:** o próprio autor

Na tabela 1 é possível visualizar a relação espécie x hospedeiro em que: i) *E. tarda*, é a primeira e mais conhecida espécie descrita, com potencial para causar doenças em humanos e animais (EWING *et al.*, 1965); ii) *E. hoshinae*, isolada

de répteis e aves aquáticas (GRIMONT *et al.*, 1980a); e iii) *E. ictaluri*, agente causador da septicemia entérica em *Siluriformes*, principalmente nos Estados Unidos (HAWKE *et al.*, 1981). Em 2013, o gênero foi reclassificado e mais duas espécies foram incluídas: *E. anguillarum*, agente patogênico de animais da ordem *Synbranchiformes* (PARK; AOKI; JUNG, 2012) e *E. piscicida*, que se destaca por infectar diversas classes de peixes (ABAYNEH; COLQUHOUN; SØRUM, 2013; LEUNG *et al.*, 2019).

### 2.2.2 Sinais clínicos

Em geral, os peixes acometidos por Edwardsielose apresentam sinais clínicos inespecíficos e comuns à outras bacterioses, como natação errática, exoftalmia, melanose e ascite (BUJÁN; TORANZO; MAGARIÑOS, 2018). Durante a inspeção interna é possível observar congestão hepática e de meninges, esplénomegalia com presença de melanomacrófagos (microscopicamente) e inflamação intestinal (DA COSTA *et al.*, 2021a).

### 2.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico para doenças de peixes é de suma importância para o desenvolvimento da cadeia produtiva e da sanidade animal. Ele permite a elaboração de um plano que resultará no controle das doenças estabelecidas. Os métodos utilizados são semelhantes aos empregados para outras espécies animais, salvo algumas particularidades. A possibilidade de coletar uma amostragem de animais para monitorar as doenças é uma grande vantagem. A desvantagem está na influência aguda ou crônica que os efeitos do ambiente podem exercer em alguns resultados (COSTA *et al.*, 2021).

Por apresentar sinais clínicos inespecíficos, é necessário coletar amostras de diversos órgãos como: olho, encéfalo, rim, fígado e baço para isolar o patógeno e descartar outras doenças no plantel (CHIDEROLI *et al.*, 2017; DA COSTA *et al.*, 2021b). Para o diagnóstico, o ideal é selecionar peixes moribundos, que estejam nadando na superfície ou apresentando algum sinal clínico. Estes devem ser enviados o mais rápido possível para o laboratório realizar a autópsia, de preferência no mesmo onde será realizado o cultivo microbiológico, a fim de evitar autólise dos órgãos. Geralmente o transporte é realizado no gelo para conservar e manter a integridade da

amostra.

No laboratório os animais devem ser inspecionados interna e externamente e fragmentos dos órgãos supracitados devem ser coletados e semeados em meio de cultura apropriado de forma estéril. O crescimento de *Edwardsiella* spp. geralmente demora entre 24 e 48h, a  $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ , quando semeado em ágar Mueller Hinton, enriquecido com 5% de sangue ovino desfibrinado (FERRARI *et al.*, 2022). Além disso, sempre que possível deve-se obter o histórico da propriedade e realizar uma anamnese para direcionar o diagnóstico.

Também podem ser utilizadas técnicas moleculares, como a Polymerase chain reaction (PCR) e a Multiplex polymerase chain reaction (mPCR) para confirmar gênero ou determinar a espécie de *Edwardsiella* spp., visto que a diferenciação a este nível é muito difícil e laboriosa utilizando testes bioquímicos (DA COSTA *et al.*, 2022).

#### 2.2.4 Tratamento

O tratamento dos animais com Edwardsielose é baseado na antibioticoterapia, assim como para as outras bacterioses que acometem peixes. No Brasil, apenas duas moléculas são liberadas para uso em pisciculturas: florfenicol e oxitetraciclina (SIDAN, 2020). Um estudo utilizando oxitetraciclina relatou redução da mortalidade de tilápias do Nilo desafiadas experimentalmente com *Francisella orientalis*, demonstrando a efetividade da molécula no controle deste importante patógeno (FAVERO *et al.*, 2021). Florfenicol 50% também foi relatado diminuindo a mortalidade de robalos (female white bass *Morone chrysops* X male striped bass *M. saxatilis*) criados em água doce contra *Streptococcus iniae* (BOWKER *et al.*, 2010).

O grande problema dessas classes de medicamentos é a seleção de cepas multirresistentes, devido ao seu uso inadequado, tanto na medicina humana quanto veterinária (CHIDEROLI *et al.*, 2017). Por esse motivo, é muito importante monitorar os surtos e caracterizar o perfil de resistência das bactérias.

#### 2.2.5 Controle e profilaxia

As medidas de controle contra doenças bacterianas em peixes envolvem primeiramente técnicas adequadas de manejo, controle da qualidade da

água, e utilização de fármacos (BOWKER *et al.*, 2010; FAVERO *et al.*, 2021), como dito anteriormente, incrementação da dieta com compostos imunoestimulantes para fortalecer o sistema imunológico dos animais e práticas de biossegurança, como quarentena na aquisição de novos animais, solicitação de laudos que atestem os animais como livres de patógenos e restrição da circulação de pessoas e animais nas áreas de cultivo (BERA *et al.*, 2018).

Atualmente, existem algumas vacinas comerciais disponíveis em alguns países contra Edwardsiellose na aquicultura. Em geral, são vacinas inativadas ou uma combinação de cepas (inativada e atenuada), e conferem proteção contra *E. tarda* ou *E. ictaluri* para algumas espécies de peixes como Catfish (*Ictalurus punctatus*), Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) e Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (DU *et al.*, 2022). Além destas, diversos estudos relatam o desenvolvimento de vacinas, utilizando diferentes tecnologias, para várias espécies de peixes (LEUNG *et al.*, 2019; SAYED *et al.*, 2021; SUN; LIU; SUN, 2010; ZHOU *et al.*, 2020).

No Brasil, embora não existam vacinas comerciais disponíveis contra a Edwardsiellose, algumas empresas disponibilizam vacinas autógenas contra as principais enfermidades bacterianas na aquicultura. A empresa Inata, por exemplo, apresenta formulações contendo cepas de *E. tarda* e *E. anguillarum*, no entanto, não se sabe qual é a eficácia destes produtos (<https://inata.com.br/peixes/vacinas-autogenas-para-peixes/>).

### 2.3 EDWARDSIELLA PISCICIDA – PATOGENIA E FATORES DE VIRULÊNCIA

A *E. piscicida* é o agente etiológico causador da septicemia entero-hemorrágica que pode acometer peixes marinhos e de água doce, capaz de levar a morte e causar graves prejuízos às pisciculturas. Os peixes acometidos podem apresentar edema cutâneo, ulceração das brânquias e necrose de órgãos internos e musculatura (ZHOU *et al.*, 2020). Sabe-se também que a espécie tem grande capacidade de transferir genes de resistência para outras bactérias e para o microbioma ambiental (VAYSSIER-TAUSSAT *et al.*, 2014).

Por serem patógenos intracelulares facultativos, interagem de diferentes maneiras com as células do hospedeiro. Assim, as bactérias podem ser internalizadas, modificar o ambiente intracelular e impedir a fusão entre endossomo e lisossomo nos vacúolos; permanecer neles e seguir o fluxo endocítico; ou ainda se

replicar no citoplasma do hospedeiro ao escaparem da estrutura vacuolar (LEUNG *et al.*, 2019).

Estudos demonstraram um importante papel da condensação de actina e de microtúbulos para a internalização de *E. piscicida* no epitélio de carpas e macrófagos de camundongos (LING *et al.*, 2000; SUI *et al.*, 2017). Ling *et al.* (2000) ainda sugeriram três possíveis portas de entrada do patógeno por meio da realização de um estudo pela via de imersão: brânquias, pele e sistema gastrointestinal. Acredita-se que, após a entrada, a bactéria se replica primeiramente nas células intestinais e depois nas células fagocíticas, até a progressão para a infecção sistêmica, onde os hospedeiros geralmente morrem por falência múltipla dos órgãos.

Diversos fatores de virulência foram descritos em *E. piscicida*. Dentre eles, os principais são os sistemas de secreção tipo III (SST3) e tipo VI (SST6), essenciais para sua patogênese (VIEIRA, 2009). O SST3 é uma estrutura flagelar que funciona como uma “agulha” e insere proteínas efetoras diretamente no citoplasma das células hospedeiras, através de um poro formado na sua membrana por proteínas translocadas (LEUNG *et al.*, 2019). Esse sistema é composto pelo aparato de injeção (*EseB* e *EseD*), proteínas reguladoras (*EsrA-EseE*, e *EsrC*), proteínas efetoras (*EseG/J/K/H/N/L/M*, *TrxI*) e chaperonas (*EseC/A/E*). As proteínas efetoras formam inflamassomas (NLRC4 e NLRP3), promovem a colonização bacteriana e desestabilização de microtúbulos (YOON *et al.*, 2020).

O SST6 também é dependente de contato e possui uma cauda contrátil para perfurar a membrana e injetar as proteínas efetoras nas células-alvo (LEUNG *et al.*, 2019). Seu componente de espícula (*VgrG*) é a estrutura que perfura a célula-alvo, com auxílio do tubo HCP (YOON *et al.*, 2020). Ambos os sistemas já foram descritos desempenhando papéis relacionados à resistência bacteriana ao estresse, formação de biofilme e inibição das defesas imunológicas do hospedeiro.

Além destes, uma série de reguladores da expressão gênica e outros fatores relacionados a adesão, proteínas de membrana, catalase, hemolisinas, citotoxinas, sistemas de dois componentes, flagelina, fatores de estresse ambiental e inibidores de lisozima também já foram identificados (JIN *et al.*, 2022).

Sistema de 2 componentes como *EsrA/EsrB*, *qseB/qseC*, *BasS/BasR* e outros já foram descritos como reguladores da expressão de genes envolvidos com fatores de virulência. O sistema *EsrA/B* está relacionado com a regulação de SST3 e

SST6 para colonizar macrófagos, enquanto *qseB/C* inibe a biossíntese e motilidade de flagelos e estimula a expressão do SST3 após a invasão das células hospedeiras em *E. tarda*, auxiliando na adaptação do patógeno ao estilo de vida intracelular (PARK; AOKI; JUNG, 2012). Recentemente, um estudo demonstrou que o sistema BasS/R regula positivamente a expressão de *EsrB*, e conseqüentemente controla a secreção de proteínas dos sistemas de secreção ao detectar a presença de ferro no ambiente (AHMED *et al.*, 2022).

Muitas proteínas são indispensáveis para que os processos de invasão, adesão e colonização sejam bem-sucedidos. Elas participam de diferentes processos e tem as mais variadas funções como fatores de virulência. Proteínas como as flagelinas são importantes e estão envolvidas com a motilidade e penetração da bactéria nas células do hospedeiro (YOON *et al.*, 2020). Adesinas, proteínas fimbriais e hemaglutininas fazem parte da adesão às células do hospedeiro (SAKAI *et al.*, 2007). A protease *FtsH* está intimamente relacionada com a importantes funções celulares em procaríotos. Em *E. piscicida*, regula a secreção de proteínas de membrana, fundamentais para a virulência bacteriana. As principais proteínas envolvidas neste processo são *Clp* e *Lon*, que atuam degradando reguladores de virulência ou fornecendo uma maior resistência a condições adversas (WANG *et al.*, 2021).

Jin e colaboradores (2022) caracterizaram recentemente a proteína *YccA* como um novo fator de virulência de *E. piscicida*, essencial para a manutenção da integridade da membrana, mobilidade do biofilme, e evasão das respostas imunes inatas do hospedeiro. Através da construção de uma cepa mutante com a deleção de *YccA*, foi possível verificar um retardo na formação de biofilme e perda significativa na integridade da membrana. Também houve redução da adesão e invasão às células do hospedeiro e diferentes níveis de espécies reativas de oxigênio e citocinas, quando comparados à cepa selvagem. Por outro lado, a introdução de um gene *yccA* expresso na cepa mutante restaurou a virulência ausente. Todos estes fatores indicam que esta proteína tem um importante papel na patogênese de *E. piscicida*.

Outras proteínas, como as de estresse universais, são importantes na adaptação das bactérias a diversos fatores de estresse ambientais e auxiliam na sua adaptação ao ambiente do hospedeiro. Utilizando a mesma metodologia com cepas mutantes, a deleção do gene *usp13* de *E. piscicida* demonstrou o comprometimento da sua tolerância a alta temperatura, peróxido de hidrogênio e baixo pH, além de

retardo no crescimento de biofilme e diminuição da resistência contra componentes do soro. Além disso, também houve diminuição da capacidade de invadir o tecido do hospedeiro (FANG *et al.*, 2019).

Em resumo, a patogenicidade de *E. piscicida* ainda não é totalmente esclarecida e há um grande interesse por parte dos pesquisadores em identificar e caracterizar os fatores de virulência presentes nas cepas desta espécie para compreender melhor seus mecanismos.

#### 2.4 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS NA AQUICULTURA

Assim como nas demais produções animais, a utilização de antimicrobianos é a principal medida de escolha para o controle de enfermidades de origem bacteriana (LULIJWA; RUPIA; ALFARO, 2020). A resistência a antimicrobianos é frequentemente mediada por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons. A transferência desses elementos é mais simples do que a transferência de DNA cromossômico. Um estudo conduzido com uma cepa de *E. piscicida* altamente virulenta possibilitou a identificação de um plasmídeo contendo seis genes envolvidos com a resistência a antimicrobianos a múltiplas drogas: *tetA* e *tetR* para tetraciclina, *strA* e *strB* para estreptomicina, *sullI* para sulfonamidas e *catA3* para cloranfenicol (LIU *et al.*, 2017).

Outro estudo relatou um total de 23 cepas de *Edwardsiella* spp. isoladas de surtos ocorridos no Brasil entre os anos de 2017 e 2020, sendo seis delas multirresistentes (DA COSTA *et al.*, 2021b). Bactérias resistentes como estas podem se multiplicar e trocar material genético, que pode estar localizado em ilhas de patogenicidade tanto no cromossomo quanto em plasmídeos, como é o caso de *E. piscicida*.

Assim, diante da crise de resistência aos antimicrobianos, é necessário ter cautela na sua utilização, principalmente porque os animais são produzidos na água, muitas vezes em represas, rios e bacias. Isto implica em riscos para a segurança alimentar por meio de resíduos que possam estar na água ou no próprio peixe, risco para as espécies nativas que podem ingerir as moléculas utilizadas no tratamento de peixes de cultivo, o que está diretamente ligado ao consumo de resíduos por humanos e a resistência de bactérias patogênicas ambientais, nos animais e/ou no homem, além do risco ocupacional na manipulação dos

medicamentos.

## 2.5 SEQUENCIAMENTO ILLUMINA

O sequenciamento genômico teve início em 1977, com Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Apesar de ser muito utilizado até os dias de hoje, a limitação deste processo está na capacidade de sequenciar apenas pequenos fragmentos de DNA de regiões específicas, o que torna a tarefa de sequenciar um genoma completo laborioso.

A segunda geração teve início em 2005 e permitiu gerar sequências maiores em uma única corrida, com menor custo e em menos tempo. A primeira plataforma desta geração foi o pirosequenciador 454 (RONAGHI; UHLÉN; NYRÉN, 1998). A próxima plataforma desenvolvida foi a *Illumina*, um dos métodos mais utilizados até hoje.

Nesta plataforma, a primeira etapa consiste na fragmentação de DNA, seguida da inserção de adaptadores nas extremidades destes fragmentos, que se ligarão a adaptadores complementares que povoarão uma placa de vidro chamada *flow cell* (KOROSTIN *et al.*, 2020). A polimerase vai então amplificar a sequência da fita simples ligada à *flow cell* e esta será removida, restando apenas a fita complementar produzida. A extremidade livre da nova fita vai então se dobrar e ligar ao outro adaptador disponível na *flow cell*, fazendo a chamada amplificação em ponte. Este processo se repete muitas vezes e, ao final, muitos fragmentos iguais são obtidos. A fita reverse será clivada e removida por lavagem para que haja o sequenciamento de cada uma das fitas em ambos os sentidos, mas separadamente. Esses agrupamentos que se formam na *flow cell* são chamados de *clusters* (MARDIS, 2008). Para o sequenciamento, haverá a incorporação de nucleotídeos marcados com fluorescência e a emissão de sinais de luz a cada ciclo. Cada nucleotídeo é marcado com uma cor diferente e dessa forma é possível registrar qual nucleotídeo foi incorporado em cada *cluster*. Após o término, o mesmo processo ocorrerá para a fita complementar (SILVA; LIMA; SOUZA, 2022).

## 2.6 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

A bioinformática pode ser entendida como uma jovem ciência, que

abrange diversas áreas do conhecimento. Dentre elas estão a química, física, biologia celular, biologia molecular, e muitas outras. Para Almeida et al. (2014), “a bioinformática se refere ao emprego de ferramentas computacionais no estudo de problemas e questões biológicas”, mas sua aplicação vai muito além de qualquer definição enrijecida. Uma breve explanação sobre algumas ferramentas de bioinformática utilizadas na construção deste trabalho será realizada a seguir.

### 2.6.1 *PlasmidFinder*

Os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossomais com capacidade de replicação independente através de regiões chamadas *replicons*. Além disso, essas estruturas são facilmente transferidas entre diversas espécies bacterianas, o que confere características de virulência, bem como resistência a antimicrobianos (SHINTANI; SANCHEZ; KIMBARA, 2015).

O aumento do sequenciamento de genomas completos trouxe a necessidade de uma ferramenta para detectar com facilidade a presença dos plasmídeos. A ferramenta *PlasmidFinder* é uma base de dados que reúne 559 plasmídeos de interesse utilizando o algoritmo BLASTn para determinar a identidade entre genomas obtidos por sequenciamento de diferentes plataformas. Após carregar a sequência é possível selecionar o limite percentual de identidade (%ID) com o banco de dados de *replicons*, que varia de 50 a 100%, sendo o ID padrão 80%. Havendo *hits*, o arquivo de saída reúne dados como: em qual contig está contido o *replicon*, qual sua posição no contig, a %ID, comprimento do *hit* e da sequência do *replicon* (CARATTOLI et al., 2014a).

### 2.6.2 *ResFinder*

A resistência a antimicrobianos é uma questão preocupante e de importância global, visto que há uma forte pressão de seleção sobre as bactérias multirresistentes e que a descoberta de moléculas eficazes no tratamento de bacterioses não acompanha a evolução dos mecanismos destes patógenos. Muitos genes estão envolvidos no processo de resistência e sua identificação e caracterização são importantes para detectar fenótipos não suscetíveis e cepas resistentes (CHIDEROLI et al., 2017).

Por esse motivo, a ferramenta *ResFinder* foi desenvolvida em 2012, com o objetivo de identificar genes de resistência a antimicrobianos adquiridos em sequências genômicas de maneira simples e acessível. Para isso, um banco de dados de genes foi formado com sequências disponíveis no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e a coleção foi disponibilizada para acesso público. Sequências de genomas montados são comparadas a todos os genes contidos no banco e as correspondências com no mínimo 2/5 do comprimento do gene são identificadas. Assim como no *PlasmidFinder*, é possível selecionar a %ID (80 a 100%) e o ID padrão é 100% (FLORENSA *et al.*, 2022).

### 2.6.3 Ilhas genômicas

As bactérias são organismos com alta plasticidade genômica e com grande capacidade de adaptação a ambientes e hospedeiros. A transferência horizontal ocorre pelos mecanismos de transformação, transdução, conjugação ou ainda por mecanismos não canônicos, que envolvem vesículas de membranas, estruturas semelhantes a pilus chamadas de nanotubos ou agentes de transferência semelhantes a fagos. A incorporação de grandes sequências genômicas é chamada de ilhas genômicas. Estas podem conter genes relacionados a virulência, resistência a antimicrobianos, metabolismo e simbiose (ARNOLD; HUANG; HANAGE, 2022).

O *software* GIPSy foi desenvolvido para prever ilhas genômicas e contribuir para a compreensão da plasticidade bacteriana, bem como as adaptações e evolução de seus genomas. Para isso são executadas oito etapas que buscam desvios no conteúdo de guanina + citosina, presença de genes de transposases, fatores de virulência, metabolismo, resistência a antimicrobianos ou simbiose, genes flanqueadores de tRNA e ausência em outros organismos do mesmo gênero ou espécies próximas não patogênicas, que são utilizadas como referência para comparação (SOARES *et al.*, 2016). A visualização dos dados gerados é realizada através da plataforma integrada Artemis (CARVER *et al.*, 2012).

## 2.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A filogenética é uma ciência que busca inferir a história evolutiva dos organismos. Antes do advento das técnicas moleculares e do sequenciamento

genômico, as relações eram inferidas com base nas características morfológicas e anatômicas, mas, atualmente, podem ser estabelecidas relações entre diferentes espécies, através da análise de sequências de nucleotídeos, ou genomas completos (CALDART *et al.*, 2016).

Neste contexto, a filogenômica é uma subárea da filogenia molecular que utiliza dados em escala genômica para comparar amostras. Dessa forma, é possível avaliar não apenas um único gene ou um conjunto de genes, mas sim o genoma completo deles, o que torna o resultado muito mais confiável (ALMEIDA *et al.*, 2014). Entretanto, a disponibilidade de grandes volumes de dados trouxe consigo a necessidade de novas abordagens.

Diferentes métodos podem ser utilizados para a inferência. Parte deles gera uma matriz de distância, que fornece uma medida de dissimilaridade do alinhamento. A medida mais simples de dissimilaridade é a *p-distance*. Ela fornece a quantidade de sítios (%) em que duas sequências diferem.

Modelos mais complexos avaliam múltiplas mudanças em um sítio quando há muitas divergências entre as amostras comparadas. Exemplos desta abordagem são o método da média aritmética não ponderada e o agrupamento de vizinhos.

Outro método utiliza algoritmos para otimização dos dados. Nele são avaliadas diversas topologias de árvores para escolher aquela que melhor se aplica ao conjunto de dados. Exemplos são os métodos da máxima parcimônia (MP), da máxima verossimilhança (MV) e a inferência bayesiana (IB). MP se baseia no número de substituições necessárias para ajustar os dados à topologia. O algoritmo seleciona então aquela com menor número de substituições. Na MV as topologias são avaliadas de forma probabilística, com base em um modelo de substituição. A árvore selecionada é a que apresentar maior valor probabilístico. A IB também utiliza probabilidade, mas produz múltiplas árvores.

Atualmente, existem 24 genomas completos de *E. piscicida* disponíveis no *GenBank* (Acesso em 11/12/2022). Destes, a grande maioria é proveniente dos Estados Unidos e Coreia do Sul, seguidos do Japão, uma cepa em Portugal e uma do Brasil (presente estudo). Conhecer as relações filogenéticas entre estas cepas da espécie *E. piscicida* são fundamentais para compreender suas transições, adaptações e evolução. Desta forma, uma melhor caracterização deste patógeno, principalmente de cepas isoladas em países que nunca haviam relatado

sua presença, é de extrema importância, para melhor compreender a proximidade filogenética, epidemiologia, além de fatores de virulência e de resistência aos antibacterianos.

### 3 REFERÊNCIAS

- ABAYNEH, T.; COLQUHOUN, D. J.; SØRUM, H. *Edwardsiella piscicida* sp. nov., a novel species pathogenic to fish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 644–654, mar. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23167785/>>. Acesso em: 20 jun. 2022.
- ÅGREN, J.; SUNDSTRÖM, A.; HÅFSTRÖM, T.; SEGERMAN, B. Gegenees: Fragmented Alignment of Multiple Genomes for Determining Phylogenomic Distances and Genetic Signatures Unique for Specified Target Groups. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39107, jun. 2012.
- ARKIN, A. P. *et al.* KBase: The United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase. **Nature Biotechnology** 2018 **36:7**, v. 36, n. 7, p. 566–569, 6 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nbt.4163>>. Acesso em: 22 jul. 2022.
- ARNOLD, B. J.; HUANG, I. T.; HANAGE, W. P. Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 206–218, 2022.
- AZIZ, R. K. *et al.* The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 8 fev. 2008. Disponível em: <<https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-75>>. Acesso em: 21 jul. 2022.
- Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data**. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 10 out. 2022.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Technical bulletin of the Registry of Medical Technologists**, v. 36, n. 3, p. 49–52, mar. 1966.
- BERA, K. K. *et al.* Biosecurity in Aquaculture: An Overview. **Aqua International**, v. 18, n. 1, p. 42–46, 2018. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/331274812>>. Acesso em: 11 dez. 2022.
- BR, P. Peixe BR da Piscicultura. **Anuario 2022**, p. 1–140, 2022.
- BUJÁN, N. *et al.* Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 30–37, 1 jan. 2018.
- CALDART, E. T.; MATA, H.; CANAL, C. W.; RAVAZZOLO, A. P. Phylogenetic analysis: Basic concepts and its use as a tool for virology and molecular epidemiology. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 1, p. 1–20, 2016.
- CARATTOLI, A. *et al.* In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrobial Agents and**

**Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3895–3903, 2014a. Disponível em:

<<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02412-14>>. Acesso em: 29 dez. 2022.

CARVER, T. *et al.* Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. v. 28, n. 4, p. 464–469, 2012.

Disponível em: <<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/>>. Acesso em: 30 dez. 2022.

CHEN, J. *et al.* The UhpA mutant of *Edwardsiella piscicida* enhanced its motility and the colonization in the intestine of tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 104, p. 587–591, 1 set. 2020.

CHIDEROLI, R. T. *et al.* Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. **Aquaculture**, v. 479, n. March, p. 45–51, 2017.

COSTA, A. B.; GOMES, A. L. S.; MARÇAL, L. N.; DA SILVA, T. B. A.; SOARES, J. da S. **Protocolos para Diagnóstico de Doenças em Peixes**. 1. ed. Curitiba: Appris Editora, 2021. 103 p.

DA COSTA, A. *et al.* Interspecies transmission of *Edwardsiella ictaluri* in Brazilian catfish (*Pseudoplatystoma corruscans*) from exotic invasive fish species. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 145, n. 1, p. 197–208, 15 jul. 2021a. Disponível em: <<https://www.int-res.com/abstracts/dao/v145/p197-208/>>.

DA COSTA, A. R.; CHIDEROLI, R. T.; CHICOSKI, L. M.; DE ABREU, D. C.; FAVERO, L. M.; FERRARI, N. A.; MAINARDI, R. M.; DA SILVA, V. G.; PEREIRA, U. P. Frequency of pathogens in routine bacteriological diagnosis in fish and their antimicrobial resistance. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 6, p. 3259–3272, 2021b.

DE PADUA, S. B.; FIGUEIREDO, H. **Lactococose: doença emergente na tilapicultura brasileira – O Presente Rural**. Disponível em:

<<https://opresenterural.com.br/lactococose-doenca-emergente-na-tilapicultura-brasileira/>>. Acesso em: 30 dez. 2022.

DU, Y.; HU, X.; MIAO, L.; CHEN, J. **Current status and development prospects of aquatic vaccines**. 2022. Disponível em: <<https://www.pharmaq.no/sfiles/2/54/9/>>. Acesso em: 10 dez. 2022.

EWING, W. H.; MCWHORTER, A. C.; ESCOBAR, M. R.; LUBIN, A. H. *Edwardsiella*, a new genus of Enterobacteriaceae based on a new species, *E. tarda*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 33–38, 1 jan. 1965. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-15-1-33>>. Acesso em: 3 nov. 2022.

EWING, W. H.; MCWHORTER, A. C.; LUBIN, A. H. *Edwardsiella*, a new genus of Enterobacteriaceae based on a new species, *E. Tarda*. **Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**, v. 15, n. 1, p. 3–3, 1965.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture. **Food and Agriculture**

**Organization of the United Nations**, p. 15, 2022.

FERRARI, N. A. *et al.* Genome Report of Emergent Fish Pathogen *Edwardsiella piscicida* Recovered from *Pseudoplatystoma corruscans* in Brazil . **Microbiology Resource Announcements**, 15 dez. 2022. Disponível em: <<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>>. Acesso em: 2 jan. 2023.

FLORENSA, A. F.; KAAS, R. S.; CLAUSEN, P. T. L. C.; AYTAN-AKTUG, D.; AARESTRUP, F. M. ResFinder – an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. **Microbial Genomics**, v. 8, n. 1, 2022. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC8914360/>>. Acesso em: 30 dez. 2022.

GALARDINI, M.; BIONDI, E. G.; BAZZICALUPO, M.; MENGONI, A. CONTIGuator: A bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. **Source Code for Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 1–5, 21 jun. 2011. Disponível em: <<https://scfbm.biomedcentral.com/articles/10.1186/1751-0473-6-11>>. Acesso em: 21 jul. 2022.

GORIS, J. *et al.* DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International journal of systematic and evolutionary Microbiology**, v. 57, n. Pt 1, p. 81–91, jan. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17220447/>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

GRIFFIN, M. J. *et al.* Comparative analysis of *Edwardsiella* isolates from fish in the eastern United States identifies two distinct genetic taxa amongst organisms phenotypically classified as *E. tarda*. **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 3–4, p. 358–372, 30 ago. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23623688/>>. Acesso em: 1 jan. 2023.

GRIFFIN, M. J. *et al.* Emergence of *Edwardsiella piscicida* in Farmed Channel ♀, *Ictalurus punctatus* × Blue ♂, *Ictalurus furcatus*, Hybrid Catfish Cultured in Mississippi. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, n. 2, p. 420–432, 1 abr. 2019.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; RICHARD, C.; SAKAZAKI, R. *Edwardsiella hoshinae*, a new species of enterobacteriaceae. **Current Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 347–351, 1980a.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; RICHARD, C.; SAKAZAKI, R. **Current Microbiology, an international journal Edwardsiella hoshinae, A New Species of Enterobacteriaceae.** [s.l.: s.n.].

HAWKE, J. P.; MCWHORTER, A. C.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 31, n. 4, p. 396–400, 1 out. 1981. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-31-4-396>>. Acesso em: 20 jun. 2022.

JOSHI, R.; ALMEIDA, D. B.; DA COSTA, A. R.; SKAARUD, A.; DE PÁDUA PEREIRA, U.; KNUTSEN, T. M.; MOEN, T.; ALVAREZ, A. T. Genomic selection for

resistance to Francisellosis in commercial Nile tilapia population: Genetic and genomic parameters, correlation with growth rate and predictive ability. **Aquaculture**, v. 537, 15 maio 2021.

LEUNG, K. Y.; WANG, Q.; YANG, Z.; SIAME, B. A. *Edwardsiella piscicida*: A versatile emerging pathogen of fish. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 555–567, 2019.

LING, S. H. M.; WANG, X. H.; XIE, L.; LIM, T. M.; LEUNG, K. Y. Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in in vivo and in vitro fish models. **Microbiology**, v. 146 ( Pt 1), n. 1, p. 7–19, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10658647/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

LIU, Y.; GAO, Y.; LIU, X.; LIU, Q.; ZHANG, Y.; WANG, Q.; XIAO, J. Transposon insertion sequencing reveals T4SS as the major genetic trait for conjugation transfer of multi-drug resistance pEIB202 from *Edwardsiella*. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, 12 maio 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31411111/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

LIU, Y. Y.; CHIOU, C. S.; CHEN, C. C. PGADB-builder: A web service tool for creating pan-genome allele database for molecular fine typing. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–5, 2016.

LULIJWA, R.; RUIPIA, E. J.; ALFARO, A. C. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 640–663, 1 maio 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/raq.12344>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

MORO, G. V.; REZENDE, F. P.; ALVES, A. L.; HASHIMOTO, D. T.; VARELA, E. S.; TORATI, L. S. **Piscicultura de água doce - Multiplicando conhecimentos**. [s.l.: s.n.]39–42 p.

PARK, S. Bin; AOKI, T.; JUNG, T. S. Pathogenesis of and Strategies for Preventing *Edwardsiella Tarda* Infection in Fish. **Veterinary research**, v. 43, n. 1, p. 67, out. 2012.

PINHEIRO, Y. C. **Avaliação física de filés de tilápia**. 2019. 2019.

DA COSTA, A. R. *et al.* Multiplex PCR assay for correct identification of the fish pathogenic species of *Edwardsiella* genus reveals the presence of *E. anguillarum* in South America in strains previously characterized as *E. tarda*. **Journal of Applied Microbiology**, p. 132, 2022.

RONAGHI, M.; UHLÉN, M.; NYRÉN, P. A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. **Science**, v. 281, n. 5375, p. 363–365, 17 jul. 1998. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.281.5375.363>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

SAKAMOTO, T. Ferramentas para análise filogenética e de distribuição taxonômica de genes ortólogos. **Dissertações e Teses**, p. 114, 2016.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463, 1977. Disponível em: </pmc/articles/PMC431765/?report=abstract>. Acesso em: 11 dez. 2022.

SAYED, M. *et al.* Virulence and live vaccine potential of *Edwardsiella piscicida* phoP and phoQ mutants in catfish against edwardsiellosis. **Journal of Fish Disease**, v. 44, p. 1463–1474, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfd.13453>. Acesso em: 10 dez. 2022.

SHAO, S.; LAI, Q.; LIU, Q.; WU, H.; XIAO, J.; SHAO, Z.; WANG, Q.; ZHANG, Y. Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain ET080813T encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters: Propose a novel species as *Edwardsiella anguillarum* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 36–47, 1 fev. 2015.

SHINTANI, M.; SANCHEZ, Z. K.; KIMBARA, K. Genomics of microbial plasmids: Classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 242, 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4379921/>. Acesso em: 29 dez. 2022.

SILVA, R. C.; LIMA, A.; SOUZA, L. C. da S. Principais métodos de sequenciamento de DNA. **Scientific Electronic Archives**, v. 15, n. 10, 1 out. 2022. Disponível em: <https://sea.ufr.edu.br/SEA/article/view/1603>. Acesso em: 9 jan. 2023.

SILVA, T. S. de C. **A arte da piscicultura urbana - Portal Embrapa**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/63639196/artigo---a-arte-da-piscicultura-urbana>. Acesso em: 6 dez. 2022.

SOARES, S. C.; GEYIK, H.; RAMOS, R. T. J.; DE SÁ, P. H. C. G.; BARBOSA, E. G. V.; BAUMBACH, J.; FIGUEIREDO, H. C. P.; MIYOSHI, A.; TAUCH, A.; SILVA, A.; AZEVEDO, V. GIPSY: Genomic island prediction software. **Journal of Biotechnology**, v. 232, p. 2–11, ago. 2016.

SUI, Z. hai; XU, H.; WANG, H.; JIANG, S.; CHI, H.; SUN, L. Intracellular Trafficking Pathways of *Edwardsiella tarda*: From Clathrin- and Caveolin-Mediated Endocytosis to Endosome and Lysosome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. SEP, 6 set. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28932708/>. Acesso em: 11 dez. 2022.

SUN, Y.; LIU, C. sheng; SUN, L. Isolation and analysis of the vaccine potential of an attenuated *Edwardsiella tarda* strain. **Vaccine**, v. 28, n. 38, p. 6344–6350, 31 ago. 2010.

VAYSSIER-TAUSSAT, M. *et al.* Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. MAR, 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC3942874/>. Acesso em: 11 dez. 2022.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 406–414, 2009.

VILLARIM DE SIQUEIRA, T. **Aquicultura: a nova fronteira para aumentar a produção mundial de alimentos de forma sustentável.** [s.l: s.n.].

VINET, L.; ZHEDANOV, A. **A “missing” family of classical orthogonal polynomials.** [s.l: s.n.]v. 441689–1699 p.

WANG, D.; LAI, F.-L.; GAO, F. Ori-Finder 3: a web server for genome-wide prediction of replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 3, p. 1–13, [s.d.]Disponível em: <[http://cerevisiae.oridb.org/data\\_](http://cerevisiae.oridb.org/data_)>.

WICK, R. R.; JUDD, L. M.; GORRIE, C. L.; HOLT, K. E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLOS Computational Biology**, v. 13, n. 6, p. e1005595, 1 jun. 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1005595>>. Acesso em: 21 jul. 2022.

YANG, M. *et al.* Edwardsiella Comparative Phylogenomics Reveal the New Intra/Inter-Species Taxonomic Relationships, Virulence Evolution and Niche Adaptation Mechanisms. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 36987, 10 maio 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174861>>. Acesso em: 1 jan. 2023.

ZENG, Z. X. *et al.* **Secreted in a Type III Secretion System-Dependent Manner, EsaH and EscE Are the Cochaperones of the T3SS Needle Protein EsaG of Edwardsiella piscicida.** 2022. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence>>. Acesso em: 9 jan. 2023.

ZHOU, P. *et al.* Phenotype, Virulence and Immunogenicity of Edwardsiella piscicida Cyclic AMP Receptor Protein (Crp) Mutants in Catfish Host. **Microorganisms**, v. 8, n. 517, 2020. Disponível em: <[www.mdpi.com/journal/microorganisms](https://doi.org/10.3390/micro8050517)>. Acesso em: 10 dez. 2022.

#### 4 HIPÓTESE

A cepa brasileira de *Edwardsiella piscicida* BEP80 isolada de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) é capaz de infectar pintados e tilápias do Nilo desafiados experimentalmente, e apresenta potencial de transmissão interespecies.

A cepa brasileira de *Edwardsiella piscicida* BEP80 possui genes de resistência a diferentes antimicrobianos e importantes fatores de virulência relacionados à sua patogenicidade.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a capacidade da cepa brasileira de *Edwardsiella piscicida* isolada de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) infectar pintados e tilápias do Nilo, e caracterizar seu genoma completo quanto a filogenia, presença de genes de virulência e de resistência a antimicrobianos.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a suscetibilidade de pintados e tilápias do Nilo à cepa brasileira de *E. piscicida* isolada de pintado, BEP80, através do postulado de Koch;
- Avaliar se há potencial de transmissão interespecíes da cepa brasileira de *E. piscicida* isolada de pintado, BEP80;
- Caracterizar fenotipicamente o perfil de resistência aos antimicrobianos da cepa BEP80 através da técnica de disco-difusão em ágar;
- Sequenciar o genoma completo da cepa de *Edwardsiella piscicida* BEP80;
- Identificar *in silico* a presença de genes de resistência na cepa BEP80;
- Determinar os fatores de virulência presentes na cepa bep80;
- Avaliar a relação genética da cepa brasileira BEP80 com as demais cepas depositadas em banco público de dados GenBank através de análise filogenômica.

## 6 ARTIGO A



GENOME SEQUENCES



## Genome Report of Emergent Fish Pathogen *Edwardsiella piscicida* Recovered from *Pseudoplatystoma corruscans* in Brazil

Natália A. Ferrari,<sup>a</sup> João Vítor G. Takashe,<sup>a</sup> Flávia F. Aburjaile,<sup>b</sup> Vasco Azevedo,<sup>c</sup> Mateus M. da Costa,<sup>d</sup> Bertram Brenig,<sup>e</sup> Francisco E. P. Rocha,<sup>a</sup> Ulisses de P. Pereira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Fish Bacteriology, Department of Preventive Veterinary Medicine, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>b</sup>Preventive Veterinary Medicine Department, Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Genetics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup>Universidade do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brazil

<sup>e</sup>Department of Molecular Biology of Livestock, Institute of Veterinary Medicine, Georg August University Göttingen, Göttingen, Germany

The order of authors was determined based on cooperation for the assembly and analysis of the genome and writing of the announcement.

**ABSTRACT** *Edwardsiella piscicida* is a Gram-negative bacteria belonging to the *Hafniaceae* family which affects several species of marine and freshwater fish. We present the complete genome of *E. piscicida* strain BEP80 recovered from the Brazilian catfish named Surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*), consisting a chromosome of 3,883,256 bp and no plasmids.

The first description of the bacterial *Edwardsiella* genus occurred in 1960, with a characterization of the biochemical reactions for the species *Edwardsiella tarda* in *in vitro* tests (1). Retrospectively, the species *Edwardsiella hoshinae* and *Edwardsiella ictaluri* were also included at genus (2, 3). In recent years, the species *E. tarda* was found to comprise three phenotypically similar but genetically different taxa/genotypes, *E. tarda*, *E. anguillarum*, and *E. piscicida*, the last being more virulent for catfish than the others (4, 5). Until then, there had been no reports of *Edwardsiella piscicida* from fish in Brazil, so this is the first report of the strain deposited for this pathogen.

*Edwardsiella piscicida* strain BEP80, classified as a member of the *Gammaproteobacteria* of the order *Enterobacterales*, family *Hafniaceae*, and the genus *Edwardsiella*, was isolated at a farm with high mortality in Brazil and identified by seeding a cranial kidney fragment of a Surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) on a plate containing Mueller-Hinton agar (Kasvi, São José dos Pinhais, Brazil) enriched with 5% defibrinated sheep blood. After incubation at 29°C for 48 h, the colony was isolated and screening tests were executed (Gram stain, oxidase, and biochemical tests) to identify the bacterial genus. A single CFU was subjected to extraction of genomic DNA by use of a PureLink genomic DNA mini kit (Invitrogen, USA), according to the manufacturer's instructions. A multiplex PCR (mPCR) assay was performed to identify the bacterial species, which was characterized as *Edwardsiella piscicida* (6). For sequencing, the DNA was prepared using a NEBNext fast DNA fragmentation and library preparation kit (New England Biolabs, Inc.) sequenced on an Illumina HiSeq 2500 platform (2 × 150 bp), and FastQC v0.11.9 (7) was used to verify the sequencing quality (<https://www.bioinformatics.braham.ac.uk/projects/fastqc>).

A total of 6,289,711 reads and coverage of 282× were generated. The genome assembly was performed using Unicycler v0.4.8 (8), which generated 119 contigs. Contigs smaller than 1,000 bp were removed, and the remaining contigs were submitted to CONTIGuator v2.7.4 software (9) to assemble the scaffold. *E. piscicida* strain CZ12001 was used as a reference (GenBank accession number CP090962.1), resulting in an initial scaffold. The genome was compared with other genomes of the same species, and gaps were curated with recursive rounds of short reads mapped using the Qiagen CLC Genomics Workbench v22.1

**Editor** Frank J. Stewart, Montana State University

**Copyright** © 2022 Ferrari et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Ulisses de P. Pereira, upaduapereira@uel.br.

The authors declare no conflict of interest.

**Received** 2 August 2022

**Accepted** 25 October 2022

**Published** 9 November 2022

(<https://digitalinsights.qiagen.com/>). The complete genome was annotated by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) and Rapid Annotation using System Technology v2.0 (RAST) (10) submitted to the GenBank database. The average nucleotide identity (ANI) (11) and digital DNA-DNA hybridization (dDDH) (12) estimations were determined using the Type (Strain) Genome Server (<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>).

The BEP80 genome consists of one circular chromosome of 3,883,256 bp with a G+C content of 59.7% and no plasmid. The circularization of the genome was accomplished based on the site of origin, using Ori-Finder 3 v1.0.1 software (13) (<http://tubic.tju.edu.cn/Ori-Finder3/public/index.php>). The absence of plasmids was confirmed using PlasmidFinder (14) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>). RAST annotation predicted 3,806 genes: 3,684 coding DNA sequences (CDS), 25 rRNA genes, and 97 tRNA genes. *E. piscicida* strain BEP80 shares ANIs of 99.45% (dDDH, 96.3%) with *E. piscicida* CZ12001 (CP090962.1), 94.92% (dDDH, 59.4%) with *E. anguillarum* ET080813 (CP006664.1), 92.45% (dDDH, 48.2%) with *E. ictaluri* MS-17-156 (CP028813.1), 83.54% (dDDH, 24.7%) with *E. hoshinae* FDAARGOS 940 (CP065626.1), and 83.93% (dDDH, 25.4%) with *E. tarda* Kc-Pc-HB1 (CP023706.1).

**Data availability.** The complete genome sequence of *Edwardsiella piscicida* BEP80 has been deposited in GenBank under accession number CP101126.1, BioProject identifier PRJNA856875, BioSample identifier SAMN29594514, and Sequence Read Archive (SRA) identifier SRR21788775.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Postgraduate Program in Animal Science at the State University of Londrina (UEL, Brazil) for the financial support provided to N.A.F. by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) and to J.V.G.T. by UEL. We are also grateful to the Department of Molecular Biology of Livestock at the University of Göttingen (UG, Germany) for funding the genome sequencing and to the collaborators at the Omic Science Network (RECOM).

#### REFERENCES

- Ewing WH, McWhorter AC, Escobar MR, Lubin AH. 1965. *Edwardsiella*, a new genus of Enterobacteriaceae based on a new species, *E. tarda*. *Int J Syst Evol Microbiol* 15:33.
- Grimont PAD, Grimont F, Richard C, Sakazaki R. 1980. *Edwardsiella hoshinae*, a new species of Enterobacteriaceae. *Curr Microbiol* 4:347–351. <https://doi.org/10.1007/BF02605375>.
- Hawke JP, McWhorter AC, Steigerwalt AG, Brenner DJ. 1981. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. *Int J Syst Bacteriol* 31:396–400. <https://doi.org/10.1099/00207713-31-4-396>.
- Abayneh T, Colquhoun DJ, Sorum H. 2013. *Edwardsiella piscicida* sp. nov., a novel species pathogenic to fish. *J Appl Microbiol* 114:644–654. <https://doi.org/10.1111/jam.12080>.
- Shao S, Lai Q, Liu Q, Wu H, Xiao J, Shao Z, Wang Q, Zhang Y. 2015. Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain ET080813<sup>T</sup> encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters: propose a novel species as *Edwardsiella anguillarum* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 38:36–47. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.10.008>.
- da Costa AR, Chideroli RT, Lanes GC, Ferrari NA, Chicovski LM, Batista CE, Pandolfi VCF, Ware C, Griffin MJ, Dos Santos AR, de Carvalho Azevedo VA, da Costa MM, de Pádua Pereira U. 2022. Multiplex PCR assay for correct identification of the fish pathogenic species of *Edwardsiella* genus reveals the presence of *E. anguillarum* in South America in strains previously characterized as *E. tarda*. *J Appl Microbiol* 132:4225–4235. <https://doi.org/10.1111/jam.15538>.
- Babraham Bioinformatics. 2022. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Retrieved 10 October 2022.
- Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. 2017. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 13:e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>.
- Galardini M, Biondi EG, Bazzicalupo M, Mengoni A. 2011. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. *Source Code Biol Med* 6:11. <https://doi.org/10.1186/1751-0473-6-11>.
- Aziz RK, Bartels D, Best A, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
- Arkin AP, Cottingham RW, Henry CS, Harris NL, Stevens RL, Maslov S, Dehal P, Ware D, Perez F, Canon S, Sneddon MW, Henderson ML, Riehl WJ, Murphy-Olson D, Chan SY, Kamimura RT, Kumari S, Drake MM, Brettin TS, Glass EM, Chivian D, Gunter D, Weston DJ, Allen BH, Baumohl J, Best AA, Bowen B, Brenner SE, Bun CC, Chandonia JM, Chia JM, Colasanti R, Conrad N, Davis JJ, Davison BH, DeJongh M, Devoid S, Dietrich E, Dubchak I, Edirisinghe JN, Fang G, Faria JP, Frybarger PM, Gerlach W, Gerstein M, Greiner A, Gurtowski J, Haun HL, He F, Jain R, et al. 2018. KBase: the United States Department of Energy systems biology knowledgebase. *Nat Biotechnol* 36:566–569. <https://doi.org/10.1038/nbt.4163>.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:81–91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>.
- Wang D, Lai F-L, Gao F. 2021. Ori-Finder 3: a web server for genome-wide prediction of replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Brief Bioinform* 22:bbaa182. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa182>.
- Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, Aarestrup FM, Hasman H. 2014. In silico detection and typing of plasmids using Plasmid-Finder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 58:3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>.

**ARTIGO B (DE ACORDO COM AS NORMAS DA REVISTA "JOURNAL OF FISH DISEASES): Emergence of *Edwardsiella piscicida* isolated from pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) in Brazil: resistance profile, virulence factors, and phylogenomic analysis**

Natália Amoroso Ferrari<sup>1</sup>, João Vitor Godoy Takashe<sup>1</sup>, Raffaella Meneghetti Mainardi<sup>1</sup>, Arthur Roberto da Costa<sup>1</sup>, Barbara Emi Martins Sato<sup>1</sup>, Ulisses de Pádua Pereira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Fish Bacteriology, Department of Preventive Veterinary Medicine, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

**ABSTRACT**

The goals of this article were to verify the susceptibility of pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to the *Edwardsiella piscicida* BEP80 strain, analyze the virulence genes and carry out a comparison between the strains isolated in different countries through phylogenomic analysis. Juveniles of the species mentioned above were experimentally challenged by the intraperitoneal (IP) route, at a dose of 0.1mL of inoculum at a concentration of 10<sup>11</sup> CFU/mL. There was 100% of Nile tilapia and pintado mortality after 24 and 48 hours, respectively. Analysis of genomic islands was also carried out, focusing on pathogenicity islands, to search for genes involved with virulence factors. Thirty-seven genomic islands were identified, being 15 pathogenic. Type III and VI secretion systems and other virulence factors were found. Phylogenetic analysis showed 96% similarity with strains isolated from American catfish (*Ictalurus punctatus*) in Mississippi and a similarity between strains isolated in Asia and the United States. Thus, it is possible to conclude that the strain of *Edwardsiella piscicida* isolated in Brazil presents differences in the constitution of its genome and multidrug resistance to antimicrobials. It is pathogenic and highly virulent, both for pintado and Nile tilapia, demonstrating a potential for interspecies transmission.

**Keywords:** Antimicrobials. Edwardsielosis. Interspecies transmission Phylogenomic. Pathogenicity islands.

## INTRODUCTION

The genus *Edwardsiella* spp. was proposed for the first time in 1960, with the biochemical characterization of the species *E. tarda*, isolated from humans (EWING; MCWHORTER; LUBIN, 1965). Subsequent studies reported the ability of this species to infect a wide range of hosts, including several species of fish, mammals, birds, and amphibians (YANG *et al.*, 2012). Later, *E. hoshinae*, pathogen of birds, reptiles, and amphibians (GRIMONT *et al.*, 1980), and *E. ictaluri*, which causes infections in fish and is the main pathogen of Channel catfish (*Ictalurus punctatus*), were also included in the genus (HAWKE *et al.*, 1981).

Before 2012, *E. tarda* was considered a species with extensive genotypic and phenotypic diversity. In the following year, a comparative phylogenetic study identified two groups with distinct genotypes, previously classified as *E. tarda* because they had the same phenotype. One of the groups more closely resembled *E. ictaluri*, while the other resembled the reference strain of *E. tarda* ATCC #15947 (GRIFFIN *et al.*, 2013). In 2013, occurred a new reclassification and the taxon *E. piscicida* was adopted (ABAYNEH; COLQUHOUN; SØRUM, 2013). In 2015, *Edwardsiella* taxonomy was later revised, with the inclusion of *E. anguillarum*. As *E. piscicida*, this taxon also derived from strains previously classified as *E. tarda* isolated from eels (SHAO *et al.*, 2015), but recent reports identified its presence in several fish species (Costa *et al.*, 2022). Recently, *E. anguillarum* was described as an emergent pathogen in tilapia farming (COSTA *et al.*, 2022) and *E. piscicida* was reported for the first time in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) from Brazil (FERRARI *et al.*, 2022).

Due to these taxonomy changes, several strains responsible for mortality outbreaks classified as *E. tarda* were reclassified as *E. piscicida* and *E. anguillarum*. Thus, it is necessary to obtain data from different strains isolated from different hosts and locations to determine the genome profile of this species. Using only morphological, physiological, and biochemical tests is often insufficient to classify correctly the taxonomy of pathogens at the genus and species level (BUJÁN *et al.*, 2018).

Thus, with the aid of molecular techniques and sequencing, so far, 24 complete genomes of *E. piscicida* are available in GenBank. With the vast majority of these coming from the United States and South Korea, with little information of its

spread and pathogenicity in other countries (GRIFFIN *et al.*, 2019), it is still unknown whether this pathogen is also important for other fish species, such as Nile tilapia and pintado, nor how widespread it is in countries where it had not been reported, such as in Brazil.

The present study aimed is analyzing phenotypically and genotypically a strain of *Edwardsiella piscicida* BEP80 (GenBank accession number [CP101126.1](#)) isolated from pintado in Brazil, regarding its pathogenicity for pintado and Nile tilapia, resistance profile, virulence factors and verifying phylogenetic similarity with the other strains available in the database GenBank public data through phylogenetic analysis and bioinformatics tools.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial isolation**

The strain of *E. piscicida*, named BEP80, was isolated from a fragment of the cranial kidney of a pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) by the Laboratory of Bacteriology in Fish at the State University of Londrina. Sowing was performed in a sterile manner on a plate containing Mueller Hinton agar (Kasvi, São José dos Pinhais, Brazil), enriched with 5% defibrinated ovine blood. After incubation at 29°C/48h, the isolated colonies were submitted to Gram staining, oxidase, and biochemical tests for identification.

### **Koch's postulate**

Animals, experimental design, and Ethics Committee for the Use of Animals

The animals were purchased from commercial fish farms in the region of Londrina and kept for the entire period of experimentation at the Laboratory of Bacteriology in Fish at the State University of Londrina. A total of 12 Nile tilapias (20g) and 12 pintados (25g) were distributed in 4 boxes of 150L of water according to the following groups:

NC T: Nile tilapia negative control containing 6 fish. There was no experimental challenge.

NC S: Pintado negative control, containing 6 fish. There was no

experimental challenge.

PC T: Nile tilapia positive control containing 6 fish. There was experimental challenge.

PC S: Pintado positive control, containing 6 fish. There was experimental challenge.

The animals were kept in acclimatization for 10 days, receiving commercial feed with 36% BP for Nile tilapias and 42% BP for pintados. During this stage and all the experimental period (3 days) the water parameters were monitored and adjusted to optimal levels for the species (total ammonia: <1ppm, pH: 6,8 – 7,2, temperature:  $29 \pm 2^\circ\text{C}$ , and dissolved  $\text{O}_2$  level: >4,5 mg/L). There was constant renewal of water and photoperiod of 12 hours. The experiment took place after approval by the Ethics Committee for the Use of Animals, under number 030.2020.

#### Inoculum

The inoculum was prepared by sowing an isolated colony of *E. piscicida* BEP80 in 10mL of Brain Heart Infusion broth (BHI broth), incubated for 24 hours. After incubation, the optical density of the inoculum was measured using a spectrophotometer, Gram stain to confirm its purity, and bacterial count. For counting, a serial dilution (1:10) was performed using 100 $\mu\text{l}$  of inoculum and 900 $\mu\text{l}$  of sodium chloride (NaCl 8.5%). After dilution, 5 drops of the -5, -7, -8 and -9 dilutions were seeded on Mueller Hinton agar (Kasvi, São José dos Pinhais, Brazil) enriched with 5% defibrinated ovine blood and incubated at  $29^\circ\text{C}/24\text{h}$ . The next day colonies were counted using the formula  $CB = \left(\frac{\epsilon CG}{5}\right) \times FC \times DILUTION$ .

#### Experimental challenge

The fish in the positive control groups were anesthetized with benzocaine at a dose of 50mg/L of dechlorinated water and inoculated intraperitoneally with 0.1mL of the inoculum at  $5 \times 10^{11}$  CFU/mL. The negative control groups underwent the same procedure but were inoculated with NaCl (8,5%) at the same dosage and route as the other groups. After that, the fish were monitored at least 5x/day to assess clinical signs and mortality.

### *E. piscicida* reisolation

The fish that died were inspected for clinical signs and processed for bacterial reisolation. Fragments of eye, brain, cranial kidney, and liver of all fish were seeded aseptically on blood agar. Plates were incubated at 29°C for up to 48 hours and the colonies identified following the same identification key used previously. These organs were chosen because some clinical signs of edwardsielosis are nonspecific, and they are organs of predilection of the bacterium.

### **DNA extraction, multiplexPCR, and sequencing**

For DNA extraction, a single colony was selected, and its DNA was extracted with the PureLink genomic DNA mini kit (Invitrogen, USA), according to the manufacturer's instructions. The nucleic acid extracted was subjected to an mPCR to determine the species of bacteria (Costa et al., 2022). For sequencing, genomic DNA was prepared using the NEBNext fast DNA fragmentation and library preparation kit (New England Biolabs, Inc.). The material was sequenced on the Illumina HiSeq 2500 platform (2 x 150 bp).

### **Genome assembly**

The steps for genome assembly of *Edwardsiella piscicida* strain BEP80 were published by Ferrari et al. (2022).

### **Phenotypic susceptibility testing and search for antimicrobial resistance genes**

To carry out the phenotypic test, the disk-diffusion technique in agar was performed (BAUER *et al.*, 1966). Antimicrobials of the following classes were tested: aminoglycosides,  $\beta$ -lactams, monobactams, amphenicols, 1st, 2nd, 3rd, and 4th generation cephalosporins, lincosamines, 2nd generation quinolones, fluoroquinolones, tetracyclines, carbapenem, nitrofurans, polymyxin, and sulfonamides. The genotypic test to search for resistance genes was performed using the software ResFinder v. 4.1 (FLORENSA *et al.*, 2022).

## Genomic islands

The genomic plasticity of the BEP80 strain was performed using the GIPSy tool (SOARES *et al.*, 2016), to identify regions acquired through horizontal gene transfer (HGT). These regions are predicted by identifying deviations in the genomic signature (GC content and codon usage); presence of transposases, virulence, resistance, metabolic, and symbiotic factors; presence of inserts or tRNA genes and the absence of these structures. A non-pathogenic (*Obesumbacterium proteus* DSM 2777 ([CP014608.1](https://ncbi.nlm.nih.gov/nucl/CP014608.1)), bacterium, from the same Order as *Edwardsiella spp* (*Enterobacterales*), was used for comparison. The visualization of the results was made with the software Artemis (CARVER *et al.*, 2012).

## Phylogenomic analysis

The sequenced genome of BEP80 strain was compared with other *E. piscicida* genomes available on the NCBI platform using Gegenees software version 3.1 (ÅGREN *et al.*, 2012) and wgMLST (Liu *et al.*, 2016) seeking to trace genetic similarities between the isolates. The phylogenetic tree for strain comparison was obtained with the software FigTree version 1.4.3 with the maximum likelihood method (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

## RESULTS

### Bacterial isolation

In Gram, the strain presented itself in the form of a Gram-negative bacilli negative for oxidase production. In the biochemical tests using the Bactray 1 test (Laborclin) the strain was negative for Ortho-nitrophenyl-galactopyranoside, arginine, urea, glucose, Phenylalanine, and citrate, however, was positive for lysine, ornithine, sodium thiosulfate, and indole. Due to limitation in the sensitivity of the Bactray kit the strain was identified as *E. tarda* (99.9%).

### Koch's postulate

Both, pintados and Nile tilapia species ( $5 \times 10^{11}$  CFU/mL) were highly susceptible to infection by *E. piscicida* BEP80, with mortality of 100% of the animals

up to 24 and 48 hours after challenge, respectively. Due to the acute mortality of the animals, no clinical signs were observed. In necropsy, the animals presented mainly brain congestion and dilatation and serositis of stomach and intestinal loops, as in Table 1.

Both, in the brain and in kidney, *E. piscicida* was reisolated in all the animals, with only a variation in the eye for pintado (66.6%) and in the liver for tilapia (50%). Reisolated colonies were identified and all of them were classified as the *E. piscicida* strain BEP80. In this way, it was possible to close Koch's postulate for the pintado and Nile tilapia (Table 2).

### **Phenotypic susceptibility test and search for antimicrobial resistance genes**

In the antimicrobial susceptibility test, our strain demonstrated resistance to Amicacin, Bacitracin, Clindamycin, Gentamicin, Lincomycin, Neomycin, Sulfazotrim, and Tetracyclin (Table 3). No resistance genes were detected using the ResFinder software.

### **Virulence factors**

The genomic plasticity analysis found a total of 37 genomic islands, 15 pathogenic, 4 metabolic, 9 resistance, and 9 symbioses. This study focuses on the genes involved with virulence factors contained in pathogenic islands.

Among them, the type III and VI secretion systems were found in the *E. piscicida* strain BEP80. Some proteins involved with host cell adine (adhesins and hemagglutinins and fimbrial proteins), carrier proteins (MMPL Family transporter) and secretory proteins (IB/FhaC/HecB Family hemolysin secretion/activation protein) were found. Genes related to the adaptation of the pathogen to the conditions of environmental and host stress such as *usp* are also present. ABC transporter proteins were found in pathogenicity (PI) islands 3, 7 and 10 and protease *FtsH*, *Clp* and *Lon* were found in PI 13. In addition to proteases, PI 13 is a phage region, with many homologous proteins of unknown function.

The *Ycca* protein, recently described as a new virulence factor of *E. piscicida* is also contained in the BEP80 genome. In addition to this, several regulators of two components were found, such as *EsrA/EsrB*, *qseB/qseC*, *BasS/BasR*.

### **Phylogenomic analysis**

Information on the location and host from which the *E. piscicida* genome strains available in the databases were isolated are contained in Table 4.

The identity matrix demonstrated through the heat map (Figure 1) found some hot spots, with 100% similarity between the *E. piscicida* strains S07-534 and S11-285, C17-087 and S07-262, CK41, EIB202, ET1, JF1305 and JF1411.

The phylogenetic tree presented in Figure 2 allows us to observe that all strains of the *E. piscicida* species are in a distinct cluster, without the species *E. tarda*, *E. anguillarum*, *E. ictaluri* and *E. hoshinae*. These species also present individual clusters, but with greater proximity between *E. piscicida* and *E. anguillarum*. The species *Hafnia alvei* was used to root the tree. According to the heat map, the cluster of *E. piscicida* varied between 89 and 100%. Some strains, like BEP80, are on individual branches even though they are within the same species cluster.

## DISCUSSION

The results of bacteria isolation are like the ones found in strains of *E. tarda* and compatible with those obtained by Abayneh and Sorum (2013) in their study for the reclassification of the species *E. piscicida*.

The results of acute mortality using high doses of the bacterium are compatible with those obtained when defying *H* intraperitoneally with the 18BJ136 strain of *E. piscicida*. All fish challenged with  $3 \times 10^5$  and  $3 \times 10^6$  CFU/mL died within 3 days. Another study using the *E. piscicida* strain EIB202 and its mutant UhpA demonstrated mortality of 43% and 63%, respectively, when challenging tilapia at  $10^{10}$  CFU/mL for the oral route (CHEN *et al.*, 2020).

Costa *et al.* (2021) also reported 100% mortality for pintado challenged with *E. ictaluri* intraperitoneally and immersion 15 and 12 days after challenge, respectively. In their study, mortality of 71.42% and 35.71% was also reported for Nile tilapia challenged by the same routes during 4 weeks of experiment. These results suggest a good susceptibility of the pintado species to multiple edwardsielosis and greater virulence of the *E. piscicida* species if we compare the rate and time to onset of mortality.

No clinical signs were observed in fish challenged with BEP80, given the acute nature of the infection. As for necropsy findings, cerebral congestion was also observed in Nile tilapia and pintado challenged with *E. ictaluri* (Costa *et al.*, 2021).

Unpublished data from our team using *E. anguillarum* strain BEP282 also demonstrated loop serositis in challenged Nile tilapia. All these studies were carried out in Brazil.

In addition to high mortality, according to the results of resistance tests, it is possible to affirm that the BEP80 strain is multiresistant, since it showed resistance to antimicrobials of the aminoglycosides, polypeptides, lincosamides, sulfonamides, and tetracyclines classes. Costa et al., (2021b) reported data from 23 strains of *Edwardsiella* spp. isolated from outbreaks that occurred in Brazil between 2017 and 2020, in which, 6 of them were multidrug resistant. Like our study, this work demonstrated a high rate of resistance to tetracycline. This result is not surprising, since its use is very common in veterinary medicine, which exerts a selection pressure on bacteria of different species. In addition, it can be concluded that the use of florfenicol is still effective in aquaculture since it is still a less used molecule than tetracycline. The same study also demonstrated resistance of 11.4% of Gram-negative bacteria to gentamicin, an aminoglycoside that may be an option to treat this group in countries where its use is authorized.

The analysis of virulence factors is in line with those already described in the literature for *E. piscicida*. Virulence factors are related to adherence, invasion and evasion of the host's immune system. Thus, the first step towards a successful infection is the ability of the pathogen to adhere to target cells. In this sense, proteins such as flagellin have been reported to aid in the motility and penetration of bacteria into cells. (YOON *et al.*, 2020). Likewise, adhesins, fimbrial proteins and hemagglutinins have also been described with functions related to the adhesion process (SAKAI *et al.*, 2007).

Zeng et al. (2022) reported that SST3 inactivation increases its 50% lethal dose by 10x (LD50%), demonstrating its importance in the virulence of *E. piscicida*. Leung et al. (2019) related SST3 and SST6 to the bacteria's intracellular lifestyle and possibly the systemic infection of the hosts using mutants of these systems that showed their ability to replicate in attenuated phagocytes, in addition to reduced bacterial loads during infections. Thus, it is possible to conclude that these virulence factors are among the most important of *E. piscicida* and that molecular studies are needed to evaluate their individual roles in the pathogenesis of this specie (EDREES *et al.*, 2018).

A large amount of ABC transporters were found in the genome of *E.*

*piscicida*. Although they are related to metabolic pathways, they can mean a good ability to adapt to different environments. In addition, some elements transported by them, such as thiamine (vitamin B1) have already been reported as essential to the pathogenesis of *E. piscicida* (LIU *et al.*, 2022).

The *usp* gene, that encodes universal stress proteins has been shown to be related to the bacteria's adaptation to the environment. Using mutant strains, the deletion of the *usp13* gene of *E. piscicida* demonstrated the impairment of its tolerance to high temperature, hydrogen peroxide and low pH, in addition to delay in biofilm growth and decrease in resistance against serum components. In addition, there was also a decrease in the ability to invade the host tissue (FANG *et al.*, 2019).

Other proteins can perform the most varied functions, such as the FtsH proteases. Its function is to control the secretion of other proteins using proteases such as Clp and Lon to degrade virulence regulatory proteins and provide greater resistance to adverse conditions. (WANG *et al.*, 2021).

Two-component systems such as EsrA/EsrB, qseB/qseC have been described as regulators of SST3 and 6 to colonize macrophages and inhibit flagellar synthesis and motility, stimulating SST3 upon entry into cells (PARK; AOKI; JUNG, 2012). By detecting iron in the environment, BasS/R upregulates EsrB expression, consequently controlling the expression of SST3 and 6 (AHMED *et al.*, 2022). Thus, they are directly linked to the expression of genes related to virulence factors.

Finally, the YccA protein has recently been linked to several mechanisms essential to *E. piscicida* virulence. Deletion of YccA in a mutant strain resulted in delayed biofilm formation and significant loss in membrane integrity, in addition to reduced adhesion and invasion to host cells. Different levels of reactive oxygen species (ROS) and cytokines were measured when compared to the wild-type strain. On the other hand, the introduction of a *yccA* gene expressed in the mutant strain restored the lost virulence (JIN *et al.*, 2022).

It should be noted that the pathogenesis of *E. piscicida* is not fully understood, but that it is related to a set of genes and factors. SST3 and 6 are still considered the main virulence factors of the species, since they are involved in resistance to stress, biofilm, adhesion and a series of mechanisms for evasion of the immune system (AHMED *et al.*, 2022; LEUNG *et al.*, 2019; YOON *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2022).

The phylogenomic analysis of *E. piscicida* showed some clusters

within the species. Strains with 100% similarity (S07-534 and S11-285) (C07-087 and S07-262) were all isolated from channel catfish in the United States. The other strains with 100% identity (JF1411, CK41, EIB202, ET1 and JF1305) were isolated from *Olive flounder* in Japan, Korea and China. It is possible to suggest that the strains circulating in North America are like each other, but it presents differences when compared with the strains circulating in Asia. Other strains are part of individual branches. BEP80 is one of them, but with greater proximity to strains isolated from channel catfish in the United States. Thus, it is possible to verify a genetic diversity in the species *E. piscicida*.

## CONCLUSION

Through this study it can be concluded that the Brazilian strain of *E. piscicida* BEP80 is pathogenic for pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) and for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), suggesting the possibility of interspecies transmission. In addition, it presents a profile of resistance to aminoglycosides, polypeptides, lincosamides, sulfonamides, and tetracyclines classes of antimicrobials and important virulence factors as type III and VI secretion systems and a series of genes, proteins and regulators essential to its pathogenicity. Finally, it was possible to verify that it is a new strain of the *E. piscicida* species, and that it is closely resembles the strains circulating in the United States. With the spread of *Edwardsiella*, new studies are necessary to better understand the mechanics and evolution of the pathogen.

## REFERENCES

- ABAYNEH, T.; COLQUHOUN, D. J.; SØRUM, H. *Edwardsiella piscicida* sp. nov., a novel species pathogenic to fish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 644–654, 1 mar. 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.12080>>. Acesso em: 14 jun. 2022.
- ÅGREN, J.; SUNDSTRÖM, A.; HÅFSTRÖM, T.; SEGERMAN, B. Gegenees: Fragmented Alignment of Multiple Genomes for Determining Phylogenomic Distances and Genetic Signatures Unique for Specified Target Groups. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39107, jun. 2012.
- AHMED, M. A. H.; CAI, J.; ZHANG, Y.; YIN, K.; WANG, Q.; SHAO, S. The cross-regulation between two-component system BasS-BasR and ferric uptake regulator Fur in virulence gene expression in *Edwardsiella piscicida*. **Aquaculture**, v. 559, p. 738405, 15 out. 2022.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Technical bulletin of the Registry of Medical Technologists**, v. 36, n. 3, p. 49–52, mar. 1966.
- BOWKER, J. D.; OSTLAND, V. E.; CARTY, D.; BOWMAN, M. P. Effectiveness of Aquaflor (50% Florfenicol) to Control Mortality Associated with *Streptococcus iniae* in Freshwater-Reared Subadult Sunshine Bass. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 22, n. 4, p. 254–265, 1 dez. 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1577/H09-010.1>>. Acesso em: 21 fev. 2023.
- BOZZA, A. N.; HAHN, N. S. Use of food resources by juveniles and adults of piscivorous fish species in a neotropical floodplain. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 217–226, 1 set. 2010. Disponível em: <<https://www.biotaneotropica.org.br/BN/article/view/653>>. Acesso em: 21 fev. 2023.
- BUJÁN, N.; MOHAMMED, H.; BALBOA, S.; ROMALDE, J. L.; TORANZO, A. E.; ARIAS, C. R.; MAGARIÑOS, B. Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 30–37, 1 jan. 2018.
- BUJÁN, N.; TORANZO, A. E.; MAGARIÑOS, B. *Edwardsiella piscicida*: a significant bacterial pathogen of cultured fish. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 131, n. 1, p. 59–71, 16 out. 2018. Disponível em: <<https://www.int-res.com/abstracts/dao/v131/n1/p59-71/>>. Acesso em: 21 fev. 2023.
- CALDART, E. T.; MATA, H.; CANAL, C. W.; RAVAZZOLO, A. P. Phylogenetic analysis: Basic concepts and its use as a tool for virology and molecular epidemiology. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 1, p. 1–20, 2018.
- CARVER, T.; HARRIS, S. R.; BERRIMAN, M.; PARKHILL, J.; MCQUILLAN, J. A. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. v. 28, n. 4, p. 464–469, 2012. Disponível em: <<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/>>. Acesso em: 30 dez. 2022.
- CHEN, J.; MU, C.; YE, T.; SUN, Y.; LUO, Q.; WANG, X. The UhpA mutant of *Edwardsiella piscicida* enhanced its motility and the colonization in the intestine of tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 104, p. 587–591, 1 set. 2020.
- CHIDEROLI, R. T.; AMOROSO, N.; MAINARDI, R. M.; SUPHORONSKI, S. A.; DE PADUA, S. B.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; MOSELA, M.; MORALES, A. T. P.; DE OLIVEIRA, A. G.; ZANOLO, R.; DI SANTIS, G. W.; PEREIRA, U. P. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. **Aquaculture**, v. 479, n. March, p. 45–51, 2017.

- DA COSTA, A.; DE ABREU, D.; TORRES CHIDEROLI, R.; ESPIRITO SANTO, Km.; DIB GONÇALVES, D.; DI SANTIS, G.; PÁDUA PEREIRA, U. Interspecies transmission of *Edwardsiella ictaluri* in Brazilian catfish (*Pseudoplatystoma corruscans*) from exotic invasive fish species. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 145, n. 1, p. 197–208, 15 jul. 2021a. Disponível em: <<https://www.int-res.com/abstracts/dao/v145/p197-208/>>.
- DA COSTA, A. R.; CHIDEROLI, R. T.; CHICOSKI, L. M.; DE ABREU, D. C.; FAVERO, L. M.; FERRARI, N. A.; MAINARDI, R. M.; DA SILVA, V. G.; PEREIRA, U. P. Frequency of pathogens in routine bacteriological diagnosis in fish and their antimicrobial resistance. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 6, p. 3259–3272, 2021b.
- EDREES, A.; ABDELHAMED, H.; NHO, S.-W.; BIN PARK, S.; KARSI, A.; AUSTIN, F. W.; ESSA, M.; PECHAN, T.; LAWRENCE, M. L. Construction and evaluation of type III secretion system mutants of the catfish pathogen *Edwardsiella piscicida* HHS Public Access. **J Fish Dis**, v. 41, n. 5, p. 805–816, 2018.
- EWING, W. H.; MCWHORTER, A. C.; LUBIN, A. H. EDWARDSIELLA, A NEW GENUS OF ENTEROBACTERIACEAE BASED ON A NEW SPECIES, E. TARDA. **BULLETIN OF BACTERIOLOGICAL NOMENCLATURE AND TAXONOMY**, v. 15, n. 1, p. 3–3, 1965.
- FANG, Q. jian; HAN, Y. xin; SHI, Y. jie; HUANG, H. qin; FANG, Z. guang; HU, Y. hua. Universal stress proteins contribute *Edwardsiella piscicida* adversity resistance and pathogenicity and promote blocking host immune response. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 95, p. 248–258, 1 dez. 2019.
- FAVERO, L. M.; FACIMOTO, C. T.; CHIDEROLI, R. T.; DA COSTA, A. R.; UMEZU, D. F.; HONDA, B. T. B.; DE OLIVEIRA, A. G.; FLAIBAN, K. K. M. da C.; DI SANTIS, G. W.; PEREIRA, U. de P. Administration of dehydrated oxytetracycline effectively reduces francisellosis mortality in Nile tilapia. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 9, p. 4116–4126, 2021.
- FERRARI, N. A.; VITOR, J.; TAKASHE, G.; ABURJAILE, F. F.; AZEVEDO, V.; DA COSTA, M. M.; BRENIG, B.; ROCHA, F. E. P.; DE, U.; PEREIRA, P. Genome Report of Emergent Fish Pathogen *Edwardsiella piscicida* Recovered from *Pseudoplatystoma corruscans* in Brazil . **Microbiology Resource Announcements**, 15 dez. 2022. Disponível em: <<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>>. Acesso em: 2 jan. 2023.
- FLORENSA, A. F.; KAAS, R. S.; CLAUSEN, P. T. L. C.; AYTAN-AKTUG, D.; AARESTRUP, F. M. ResFinder – an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. **Microbial Genomics**, v. 8, n. 1, 2022. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC8914360/>>. Acesso em: 30 dez. 2022.
- GODINHO, A. L.; KYNARD, B.; GODINHO, H. P. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 80, n. 4, p. 421–433, 2007.
- GRIFFIN, M. J.; QUINIOU, S. M.; CODY, T.; TABUCHI, M.; WARE, C.; CIPRIANO, R. C.; MAUEL, M. J.; SOTO, E. Comparative analysis of *Edwardsiella* isolates from fish in the eastern United States identifies two distinct genetic taxa amongst organisms phenotypically classified as *E. tarda*. **Veterinary microbiology**, v. 165, n. 3–4, p. 358–372, 30 ago. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23623688/>>. Acesso em: 1 jan. 2023.
- GRIFFIN, M. J.; REICHELLEY, S. R.; BAUMGARTNER, W. A.; AARATTUTHODIYIL, S.; WARE, C.; STEADMAN, J. M.; LEWIS, M.; GAUNT, P. S.; KHOO, L. H.; WISE, D. J. Emergence of *Edwardsiella piscicida* in Farmed Channel ♀, *Ictalurus punctatus* × Blue

- ♂, *Ictalurus furcatus*, Hybrid Catfish Cultured in Mississippi. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, n. 2, p. 420–432, 1 abr. 2019.
- GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; RICHARD, C.; SAKAZAKI, R. *Edwardsiella hoshinae*, a new species of enterobacteriaceae. **Current Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 347–351, 1980.
- HAWKE, J. P.; MCWHORTER, A. C.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 31, n. 4, p. 396–400, 1 out. 1981. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-31-4-396>>. Acesso em: 20 jun. 2022.
- HU, J.; WANG, B.; FENG, J.; LIU, C.; JIANG, B.; LI, W.; LIN, L.; SU, Y. *Edwardsiella piscicida*, a pathogenic bacterium newly detected in spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* in China. **Aquaculture Reports**, v. 22, 1 fev. 2022.
- JIN, M.; HE, J.; LI, J.; HU, Y.; SUN, D.; GU, H. *Edwardsiella piscicida* YccA: A novel virulence factor essential to membrane integrity, mobility, host infection, and host immune response. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 126, p. 318–326, 1 jul. 2022.
- KOROSTIN, D.; KULEMIN, N.; NAUMOV, V.; BELOVA ID, V.; KWON, D.; GORBACHEVID, A. Comparative analysis of novel MGISEQ-2000 sequencing platform vs Illumina HiSeq 2500 for whole-genome sequencing. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230301>>. Acesso em: 21 fev. 2023.
- LEUNG, K. Y.; WANG, Q.; YANG, Z.; SIAME, B. A. *Edwardsiella piscicida*: A versatile emerging pathogen of fish. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 555–567, 2019.
- LIU, X.; WANG, X.; SUN, B.; SUN, L. The Involvement of Thiamine Uptake in the Virulence of *Edwardsiella piscicida*. **Pathogens**, v. 11, n. 4, 1 abr. 2022. Disponível em: <[pmc/articles/PMC9026889/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4026889/)>. Acesso em: 21 fev. 2023.
- LIU, Y. Y.; CHIOU, C. S.; CHEN, C. C. PGADB-builder: A web service tool for creating pan-genome allele database for molecular fine typing. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–5, 2016.
- MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. 2008. Disponível em: <[www.helicosbio.com](http://www.helicosbio.com)>. Acesso em: 21 fev. 2023.
- MARIA, P.; CASTRO, G. De; ORSI, M. L. **PLANO DE RECUPERAÇÃO DO SURUBIM OU PINTADO ( *Pseudoplatystoma corruscans* )** 2022.
- PARK, S. Bin; AOKI, T.; JUNG, T. S. Pathogenesis of and Strategies for Preventing *Edwardsiella tarda* Infection in Fish. **Veterinary research**, v. 43, n. 1, p. 67, out. 2012.
- RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L.; DE OLIVEIRA, C. A. L. **Dez Anos Da Tilápia Gift No Brasil** 2016.
- ROBERTO DA COSTA, A.; TORRES CHIDEROLI, R.; CHAGAS LANES, G.; AMOROSO FERRARI, N.; MELO CHICOSKI, L.; ESTEFANI BATISTA, C.; CÉSAR FREITAS PANDOLFI, V.; WARE, C.; GRIFFIN, M. J.; RODRIGUES DOS SANTOS, A.; MATIUZZI DA COSTA, M.; DE PÁDUA PEREIRA, U. ORIGINAL ARTICLE Multiplex PCR assay for correct identification of the fish pathogenic species of *Edwardsiella* genus reveals the presence of *E. anguillarum* in South America in strains previously characterized as *E. tarda*. **J Appl Microbiol**, p. 132, 2022.
- SAKAI, T.; IIDA, T.; OSATOMI, K.; KANAI, K. Detection of Type 1 Fimbrial Genes in Fish Pathogenic and Non-pathogenic *Edwardsiella tarda* Strains by PCR. **Fish Pathology**, v. 42, n. 2, p. 115–117, 2007.
- SHAO, S.; LAI, Q.; LIU, Q.; WU, H.; XIAO, J.; SHAO, Z.; WANG, Q.; ZHANG, Y. Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain ET080813T encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters: Propose a novel species

- as *Edwardsiella anguillarum* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 36–47, 1 fev. 2015.
- SOARES, S. C.; GEYIK, H.; RAMOS, R. T. J.; DE SÁ, P. H. C. G.; BARBOSA, E. G. V.; BAUMBACH, J.; FIGUEIREDO, H. C. P.; MIYOSHI, A.; TAUCH, A.; SILVA, A.; AZEVEDO, V. GIPSy: Genomic island prediction software. **Journal of Biotechnology**, v. 232, p. 2–11, ago. 2016.
- WANG, W.; JIANG, J.; CHEN, H.; ZHANG, Y.; LIU, Q. FtsH is required for protein secretion homeostasis and full bacterial virulence in *Edwardsiella piscicida*. **Microbial Pathogenesis**, v. 161, p. 105194, 1 dez. 2021.
- YANG, M.; LV, Y.; XIAO, J.; WU, H.; ZHENG, H.; LIU, Q.; ZHANG, Y.; WANG, Q. *Edwardsiella* Comparative Phylogenomics Reveal the New Intra/Inter-Species Taxonomic Relationships, Virulence Evolution and Niche Adaptation Mechanisms. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 36987, 10 maio 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC3349661/>. Acesso em: 1 jan. 2023.
- YOON, J. Bin; HWANG, S.; BAEK, S. W.; LEE, S.; BANG, W. Y.; MOON, K. H. In vitro *Edwardsiella piscicida* CK108 Transcriptome Profiles with Subinhibitory Concentrations of Phenol and Formalin Reveal New Insights into Bacterial Pathogenesis Mechanisms. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1–15, 1 jul. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7409036/>. Acesso em: 20 fev. 2023.
- ZENG, Z. X.; LIU, L. Y.; XIAO, S. B.; LU, J. F.; LIU, Y. L.; LI, J.; ZHOU, Y. Z.; LI, C.; LIAO, J.; LI, D. Y.; ZHOU, Y.; NIE, P.; XIE, H. X. Secreted in a Type III Secretion System-Dependent Manner, EsaH and EscE Are the Cochaperones of the T3SS Needle Protein EsaG of *Edwardsiella piscicida*. 2022. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence>. Acesso em: 9 jan. 2023.

## TABLES

Gro up	Fish number	Macroscopic findings
<b>PC S</b>	S1	Brain congestion
	S2	Brain congestion, congestion in the ventral region, dilation and serositis of the stomach and intestinal loops
	S3	Brain congestion, congestion in the ventral region, dilation and serositis of the stomach and intestinal loops
	S4	Brain congestion
	S5	Brain congestion, dilation and serositis of the stomach and intestinal loops
	S6	Brain congestion, dilation and serositis of the stomach and intestinal loops
<b>PC T</b>	T1	Brain congestion, dilation and serositis of the stomach and intestinal loops
	T2	Brain congestion, dilation and serositis of the stomach and intestinal loops
	T3	Brain congestion, dilation and serositis of the stomach and intestinal loops
	T4	Brain congestion, dilation and serositis of the stomach and intestinal loops
	T5	Brain congestion, dilation and serositis of the stomach and intestinal loops
	T6	Brain congestion, dilation and serositis of the stomach and intestinal loops
<b>NC S</b>	S1 - S6	No signs
<b>NC T</b>	T1 - T6	No signs

**Table 1** – Macroscopic findings of fish challenged with *E. piscicida* BEP80. Legend: S = Pintado. T = Nile tilapia. PC = positive control. NC = negative control.

Group	Bacterial reisolation			
	Tissue			
	Eye	Brain	Cranial kidney	Liver
NC S	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
NC T	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
PC S	4/6 (66.6%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)
PC T	6/6 (100%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)	3/6 (50%)

**Table 2** – Bacterial re-isolation after mortality of Nile tilapia and pintado challenged with the BEP80 strain of *E. piscicida* intraperitoneally ( $5 \times 10^{11}$  UFC/mL)

Antimicrobial		Antimicrobial	
---------------	--	---------------	--

	BEP80 strain		BEP80 strain
Amicacin	R	Ceftazidime	S
Amoxicillin + clavulanic acid	S	Cefepime	S
Amoxicillin	S	Ceftriaxone	S
Ampicillin	S	Cefotaxima	S
Azitrionam	S	Ceftiofur	S
Bacitracin	R	Clindamycin	R
Cephalexin	S	Ciprofloxacin	S
Cephalotin	S	Cloramphenicol	S
Cefoperazone	S	Doxycycline	S
Cefovecin	S	Enrofloxacin	S
Antimicrobial	<b>BEP80 strain</b>	<b>Antimicrobial</b>	<b>BEP80 strain</b>
Streptomycin	S	Penicillin	I
Florfenicol	S	Polymyxin B	S
Gentamicin	R	Sulfazotrin, Sulfametoxazole	R
Imipenem	S	Tetracycline	R
Lincomycin	R	Tobramycin	S
Marbofloxacin	S	Cefuroxime	S
Oxacycline	S	Cefotaxima	S
Neomycin	R		
Nitrofurantoin	S		
Norfloxacin	S		

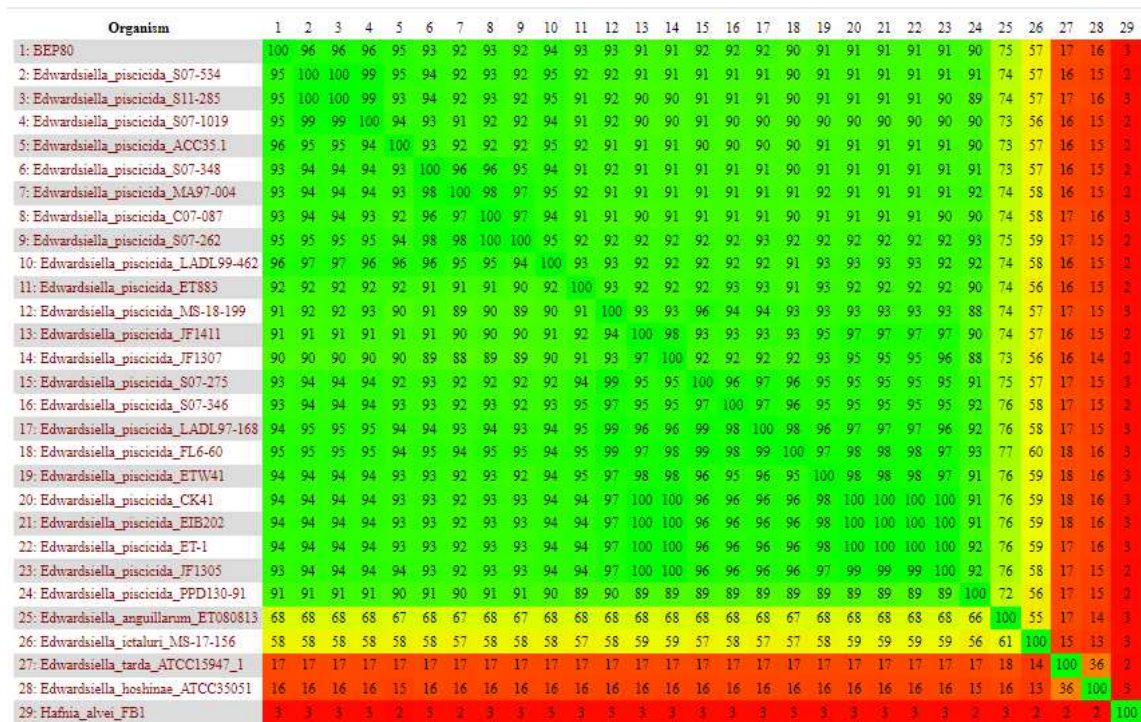
**Table 3** – Antimicrobial susceptibility test for BEP 80, *Edwardsiella piscicida* by agar disc-diffusion technique Legend: R = resistant. S = sensitive. I = intermediate halo for sensitivity.

Strain	Access Number	Isolated	Localization
MS-18-199	NZ_CP035668.1/ NZ_CP035669.1 (plasmid)	Hybrid Catfish	Mississippi – USA
JF1411	NZ_BGMK01000003.1	Olive Flounder	Japan
JF1307	NZ_BGMJ00000000.1	Olive Flounder	Japan
ETW41	NZ_CP019440.1/ CP019441.1	Water on Eel Pound	Korea
JF1305	NZ_BAYT00000000.1	Olive Flounder	Japan
EIB202	NC_013508.1/ NC_013509.1	Turbot	China
CK41	CP047671.1/ CP047672.1	Olive Flounder	Korea
ET-1	NZ_LC127084.1	Olive Flounder	Korea
S07-346	NZ_QCZU00000000.1	Channel Catfish	Mississippi – USA
S07-275	NZ_QCZT00000000.1	Channel Catfish	Mississippi – USA
LADL97-168	NZ_QCZP00000000.1/ NZ_CM009823.1	Channel Catfish	Mississippi – USA
FL6-60	NC_017309.1/ NC_017318.1	Channel Catfish	Alabama – USA
ET883	NZ_JRGQ00000000.1	European Eel	Norway
ACC35.1	NZ_MPNU00000000.1	Turbot	Spain

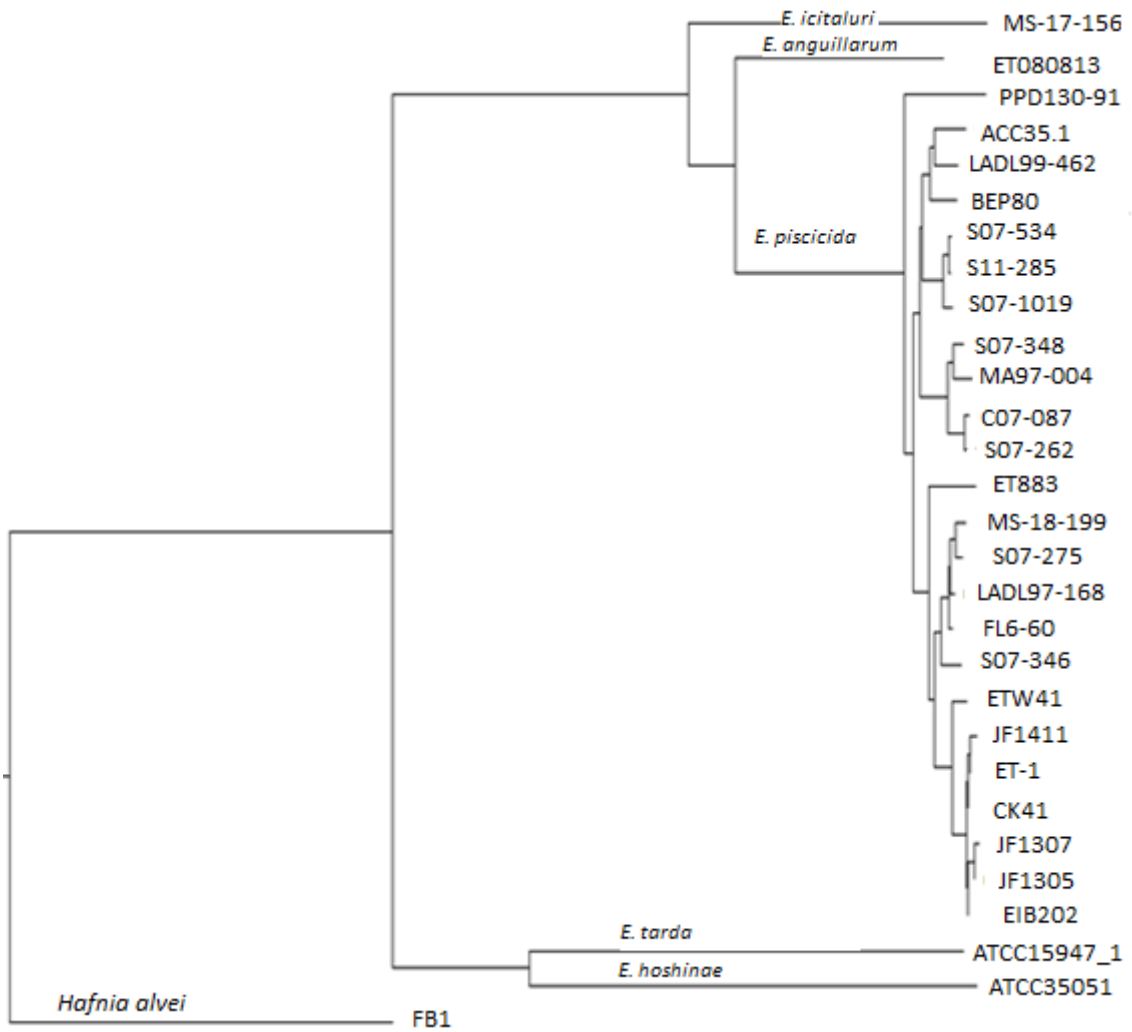
LADL99-462	NZ_QCZQ00000000.1/ NZ_CM009825.1	Channel Catfish	Louisiana – USA
S07-534	NZ_QCZW00000000.1	Channel Catfish	Mississippi – USA
S11-285	NZ_CP016044.1/ CP016445.1	Channel Catfish	Mississippi – USA
S07-1019	NZ_QCZX00000000.1/ NZ_CM009827.1	Blue Catfish	Mississippi – USA
S07-348	NZ_QCZV00000000.1/ NZ_CM009826.1	Channel Catfish	Mississippi – USA
MA97-004	NZ_QCZR00000000.1	Tilapia	Mississippi – USA
C07-087	NC_020796.1	Channel Catfish	Mississippi – USA
S07-262	NZ_QCZS00000000.1	Channel Catfish	Mississippi – USA
PPD130/91	NZ_JACQ01000000	Serpae Tetra	Singapore
<b>BEP80</b>	<b>CP101126.1</b>	<b>Pintado</b>	<b>Brazil</b>

**Table 4** – Localization and host with genomes available in the GenBank database used for comparison with BEP 80.

FIGURES



**Figure 1** – Heat map for comparison of *Edwardsiella piscicida* strains with BEP 80 and other species of the genus *Edwardsiella* spp.



**Figure 2** - Phylogenetic tree for comparison between *E. piscicida* strains with BEP 80 and other species of the genus *Edwardsiella* spp.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com esta dissertação foi possível relatar a primeira cepa de *E. piscicida* isolada em peixes no Brasil, bem como verificar sua alta patogenicidade para pintados e tilápias do Nilo, com mortalidade de 100% ao utilizar alta dose bacteriana por via intraperitoneal. Baseado no histórico de outras espécies de *Edwardsiella* spp., é possível sugerir que diferentes espécies de peixes podem atuar como transmissores de *E. piscicida*. Também foi possível sequenciar seu genoma completo para realizar análises comparativas e identificar fatores de virulência, como sistemas de secreção tipo III e VI, envolvidos na infecção do hospedeiro e uma série de genes e proteínas com função regulatória, ou envolvidas na adesão, colonização, replicação e escape do sistema imune. A cepa também foi caracterizada como multirresistente por apresentar resistência a mais de três classes de antibacterianos, embora não tenham sido encontrados genes de resistência adquiridos. Com a análise filogenômica foi possível verificar a alta similaridade da cepa brasileira isolada do pintado com cepas norte-americanas isoladas do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*). Este estudo destaca a importância e os avanços dos estudos genômicos para contribuir na caracterização e no processo evolutivo de patógenos como parte do desenvolvimento de novas alternativas no que diz respeito às doenças bacterianas na aquicultura.