

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**  
**CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

Gabriela Guerrero Soares

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA CEPA DO GÊNERO *BREVUNDIMONAS* MULTIDROGA  
RESISTENTE, ISOLADA DE UM PACIENTE NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA,  
USANDO SEQUENCIAMENTO COMPLETO DE GENOMA**

**São Carlos**

**2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**  
**CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

Gabriela Guerrero Soares

**Caracterização de uma cepa do gênero *Brevundimonas* multidroga resistente, Isolada de um Paciente na Unidade de Terapia Intensiva, usando Sequenciamento Completo do Genoma**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado junto à Universidade Federal de São Carlos como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius.

**São Carlos**

**2023**

## AGRADECIMENTOS

A meus pais, Débora e Luis, e a meu padrasto, Fábio, que me apoiaram nas minhas decisões, me inspirando todos os dias a ser uma pessoa melhor e que sempre estiveram presentes me ajudando de todas as formas possíveis durante o período desse trabalho.

A minha avó e minha tia por acreditarem em mim mesmo quando eu desacreditei. A minha família por terem me dado forças nos momentos difíceis.

A minha querida orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Cristina Pranchevicius, por ter confiado a mim esse trabalho, por ser uma esplêndida mentora e ter me guiado nessa importante etapa da minha vida.

Aos meus amigos que me deram forças, me ajudaram a relaxar para que eu conseguisse seguir centrada no projeto.

Aos meus colegas de laboratório, principalmente ao Marcelo Silvas Folhas Damas, por ter me auxiliado imensamente durante o projeto.

À FAPESP, pelo seu auxílio financeiro sem o qual eu não teria desenvolvido este projeto.

Aos membros da banca por dedicarem seu tempo e conhecimento na avaliação desse trabalho.

## RESUMO

As espécies de *Brevundimonas* têm sido consideradas um patógeno humano oportunista, que pode causar vários tipos de infecções invasivas e graves em pacientes com patologias subjacentes. Com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre essas bactérias, realizamos uma aprofundada caracterização genotípica e fenotípica de uma cepa de *Brevundimonas* isolada do líquido cefalorraquidiano de criança internada em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal. A cepa foi identificada como membro do gênero *Brevundimonas* com base nos resultados do sistema VITEK-2 e na sequência 16S rDNA. A montagem do sequenciamento completo do genoma de *Brevundimonas* sp. mostrou comprimento total de 3.261.074 pb e um conteúdo de G+C de 66,86%, semelhante ao relatado para outras espécies do gênero. As análises de *Multilocus sequence analysis* (MLSA), Type (Strain) Genome Server (TYGS), digital DNA-DNA hybridization (dDDH), e Average Nucleotide Identity (ANI) confirmaram que a cepa *Brevundimonas* sp. representa uma nova espécie, o qual propomos o nome de *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. As análises *in silico* do genoma detectaram genes associados à caracterização fenotípica, e que estão relacionados à resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (*penP*, *bla*<sub>TEM-16</sub>, *bla*<sub>BKC-1</sub>), aminoglicosídeos (*strA*, *strB*, *aac*(6')-Ib, *aac*(6')-II). Também foram encontrados genes que codificam para bomba de efluxo *AcrAB* e que conferem resistência a vários antibióticos, incluindo  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina, novobiocina e fluoroquinolonas. A resistência à colistina pode ser atribuída à mutação em *qseC* (Ile283Leu) e em *phoP* (Arg81Cis). A dupla substituição de aminoácidos em *GyrA* (S83L e D87H), e a substituição de aminoácidos em *GyrB* (Glu466-Leu) podem estar associadas à resistência às quinolonas. *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. apresentou muitos genes de virulência que estão relacionados à formação de biofilme, adesão, invasão, secreção, e que podem ser relevantes para sua patogenicidade. O genoma da *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov também continha cópias de ICEs do tipo T4SS putativos; IME putativo; elementos transponíveis do tipo Tn3, e famílias de inserções do tipo IS3, IS6, IS5 e IS1380, que sugerem um papel importante no desenvolvimento e disseminação da resistência a antibióticos e patogenicidade do isolado. Nossos dados podem servir como base para o entendimento da variabilidade genômica, da resistência aos antibióticos, da patogenicidade, e disseminação dessas cepas resistentes.

## ABSTRACT

*Brevundimonas* species have been considered an opportunistic human pathogen that can cause invasive and severe infections in patients with underlying pathologies. In order to increase our knowledge about these pathogens, we conducted in-depth genomic and phenotypic characterization of a *Brevundimonas* strain isolated from cerebrospinal fluid of a patient admitted in a neonatal intensive care unit. The strain was identified as a member of the genus *Brevundimonas* based on VITEK-2 system results and 16S rDNA sequence. Whole genome sequencing assembly of *Brevundimonas* sp. showed a total length of 3,261,074 bp and a G+C content of 66.86%, similar to other species of the genus. Multilocus sequence analysis, Type (Strain) Genome Server, digital DNA-DNA hybridization, and Average Nucleotide Identity (ANI) analyses confirmed that the *Brevundimonas* sp. studied represents a distinct species, for which we propose the name *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. In silico analysis detected genes associated with phenotypic characterization, related to resistance to  $\beta$ -lactams (*penP*, *bla*<sub>TEM-16</sub>, *bla*<sub>BKC-1</sub>) and aminoglycosides (*strA*, *strB*, *aac*(6')-Ib, *aac*(6')-II). We also found genes encoding the AcrAB efflux pump that confers resistance to a broad spectrum of antibiotics, including  $\beta$ -lactams, tetracycline, novobiocin and fluoroquinolones. Colistin resistance can be attributed to mutation in *qseC* (Ile283Leu) and in *phoP* (Arg81Cis). Double amino acid substitution in GyrA (S83L and D87H), and amino acid substitution in GyrB (Glu466-Leu) may be associated with quinolone resistance. The isolate presented many virulence genes related to biofilm formation, adhesion, invasion, secretion, and that can be relevant to its pathogenicity. *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. genome contained copies of putative T4SS-type ICEs; putative IME; Tn3-type, and IS3, IS6, IS5, and IS1380-type families, suggesting an important role in the development and dissemination of antibiotic resistance, and pathogenicity of the isolate. Our data can provide a basis for understanding genomic variability, antibiotic resistance, pathogenicity, and dissemination of these resistant strains.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Mecanismos de resistência antimicrobiana. Figura adaptada de TORTORA et al., 2016.

**Figura 2.** Estrutura dos antibióticos beta-lactâmicos. Adaptada de Williams, (1999).

**Figura 3.** Estruturas da polimixina B e polimixina E (colistina). Adaptada de VARDANYAN & HRYUBY, 2016.

**Figura 4.** Estrutura geral das fluoroquinolonas, indicando possíveis modificações estruturais nos radicais R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub> e R<sub>8</sub>. Adaptada de SOUSA et al., 2012.

**Figura 5.** Estrutura dos aminoglicosídeos amicacina e gentamicina, principais antibióticos discutidos no trabalho. Adaptada de DASCUPTA, 2012.

**Figura 6.** Estruturas gerais das Tetraciclina e Glicilciclina. Adaptada de ROSSI & ANDREAZZI, 2006 e KWIATKOWSKA et al., 2013.

**Figura 7.** Estrutura da vancomicina e da teicoplanina. Adaptada de TAO et al., 2021.

**Figura 8.** Estrutura dos antibióticos sulfonamidas. Adaptada de MARTUCCI et al., 2014

**Figura 9.** Modo de ação dos antibióticos e mecanismo de resistência bacteriana a antibióticos. Target by-pass é um mecanismo de resistência antimicrobiana que consiste em criação de novas vias para contornar a enzima alvo do antibiótico (ULUSEKER et al., 2021). Adaptada de ULUSEKER et al., 2021.

**Figura 10.** Características clínicas e fenotípicas da *Brevundimonas* sp. (A) Dados do paciente e da cepa. (B) Caracterização fenotípica de padrões de resistência da cepa *Brevundimonas* sp. Classe de antibióticos: Beta-lactâmicos (barras vermelhas e verde (carbapenêmicos)), Aminoglicosídeos (barras amarelas), Quinolona (barra roxa), Glicilciclina (barra azul), Polimixina E (barra rosa).

**Figura 11.** Dados de sequenciamento de todo o Genoma, mapa circular e distribuições de categorias de subsistemas. (A): Tabela com os dados estatísticos de montagem e anotação do genoma. (B): Representação circular do genoma. (C): Genoma anotado pelo *Rapid Annotation system Technology* (RAST). O verde no gráfico de barras corresponde à porcentagem de proteínas anotadas e o azul corresponde as proteínas não alocadas no subsistema. O gráfico em forma de “pizza” representa a distribuição percentual das categorias do subsistema. A direita do gráfico em forma de “pizza” está representada a contagem das características do subsistema.

**Figura 12.** Anotação funcional da amostra de *Brevundimonas* sp. (A) eggNOG com 4 categorias principais, sendo elas: metabolismo (barras em azul), processamento e armazenamento de informação (barras em amarelo), processos celulares e sinalização (barras em vermelho) e função desconhecida (barra em verde). (B) Distribuição da Ontologia genética da *Brevundimonas* sp. dividida em 3 categorias: função molecular (barras verdes), componentes celulares (barras amarelas) e processo biológico (barras laranjas). No eixo X temos a quantidade de termos GO por subcategoria (eixo Y).

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES (CONTINUAÇÃO)

**Figura 13.** Relação filogenética da *Brevundimonas* sp. e análise bioquímica comparativa. (A) Árvore filogenética baseada em 16S rRNA mostrando a relação entre a cepa de *Brevundimonas* sp e outras 32 sequências de genes de diferentes espécies de *Brevundimonas* da base de dados do NCBI. A descrição do nome em vermelho representa a cepa isolada nesse trabalho. (B) Características fenotípicas que diferenciam a cepa *Brevundimonas* sp. de algumas espécies *Brevundimonas* relacionadas. *Brevundimonas* sp. (dados deste estudo); *B. olei* MJ15T; *B. naejangsanensis* KCTC 22631T; *B. diminuta* KCTC 12488T; *B. vesicularis* KCTC 12421T (os dados foram retirados de LEE et al., 2010). Símbolos: +, positivo; -, negativo; W, reacção fraca; ND = nenhum dado disponível.

**Figura 15.** Análise genômica comparativa de *Brevundimonas* spp. (A) Árvore filgenetica do MLSA. (B) *Heatmap* com resultados referentes ao ANI. (C) *Heatmap* com cálculos referentes ao dDDH. (D) Árvore filogenômica baseada em resultados de TYGS mostrando a relação entre a cepa *Brevundimonas* sp com as cepas de sequências de referência *Brevundimonas* depositadas no NCBI. Árvore inferida com FastME 2.1.6.1 (LEFORT et al. 2015) a partir de GBDP (método de filogenia à distância do genoma BLAST) distâncias calculadas a partir de sequências genômicas. Os comprimentos dos ramos são escalados em termos da fórmula de distância GBDP d5. Os números acima dos ramos são valores de suporte de pseudo-bootstrap GBDP > 60 % de 100 replicações, com um suporte médio de ramo de 75,1 %. A árvore estava enraizada no ponto médio (FARRIS et al., 1972).

**Figura 15.** Análise genômica comparativa de cepas *Brevundimonas* spp e *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. (A) Árvore genômicas de genes essenciais. (B) Árvore genômicas de genes acessórios. (C) Classificação da via KEGG em genomas essenciais, acessórios e únicos. (D) Distribuição da classificação da via KEGG. (E) Diagrama de Venn e gráfico de barras mostrando os números de genes ortólogos únicos e compartilhados nas quatro cepas *Brevundimonas* mais intimamente relacionadas. (F) Número de proteínas, *clusters* e *singletons*.

**Figura 16.** Mutações que conferem resistência a Fluorquinolonas e Colistina (MINARINI & DARINI, 2012; WEIGEL et al., 1998; HAN & ANDRADE, 2005; PITT et al., 2019; BERGLUND, 2019).

**Figura 17.** Elementos moveis identificados na *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. (A) Tabela com MGEs encontrados na *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. (B) Representação gráfica dos *scaffolds* 1,2,11,12,15,16,17,18,36 e 38 com os MGEs e genes de resistência e virulência. Linha preta representa a fita de DNA do *scaffold*, a linha azul representa as ICEs. Os triângulos vermelhos e verdes claro são os *attLs* e *attRs* respectivamente. Os retângulos laranja claro são os *transposons* e os círculos azul escuro são as sequências de inserção. Os genes são representados pelas flechas, as flechas verdes escuras são os genes referentes a conjugação dos ICEs, as flechas amarelas são os genes de virulência e as flechas roxas são os genes de resistência.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Sequências 16S rRNA utilizadas para montar a árvore filogenética de análise do 16S rRNA.

**Tabela 2.** *Brevundimonas* ssp. utilizadas na análise de MLSA juntamente com seu número de acesso e tipo de anotação.

**Tabela 3.** *Brevundimonas* ssp. utilizadas na análise de cálculo de ANI e dDDH com seus respectivos números de acesso.

**Tabela 4.** Genomas referências utilizados na análise TYGS e seus devidos números de acesso.

**Tabela 5.** Genomas de *Brevundimonas* utilizados na análise de *core* e *accessory* genoma.

**Tabela 6.** Cepas e análise de ANI e dDDH contra a cepa isolada *Brevundimonas* sp.

**Tabela 7:** Genes de resistência da cepa *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov.

**Tabela 8:** Genes de virulência da cepa *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov.



## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....</b>	<b>15</b>
1.2.1 Mecanismos de resistência.....	16
<b>1.2 IMPACTOS DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3 PRINCIPAIS CLASSES DE ANTIBIÓTICOS E SEUS MECANISMOS DE FUNCIONAMENTO .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4 GÊNERO BREVUNDIMONAS.....</b>	<b>24</b>
1.4.1 Brevundimonas vesiculares.....	24
1.4.2 Brevundimonas diminuta .....	25
<b>1.5 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DE GENOMA - WGS.....</b>	<b>25</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>26</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 ASPECTOS ÉTICOS .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 INFORMAÇÃO E ISOLAMENTO DA CEPA .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3 SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....</b>	<b>28</b>
<b>3.5 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO .....</b>	<b>28</b>
<b>3.6 MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA .....</b>	<b>28</b>
<b>3.7 GENES COG, EGGNOG E GO .....</b>	<b>29</b>
<b>3.8 ANÁLISE FILOGENÉTICA DO 16S rRNA .....</b>	<b>29</b>
<b>3.9 TESTES BIOQUÍMICOS .....</b>	<b>31</b>
<b>3.10 ANÁLISE DE SEQUÊNCIA MULTILOCUS (MLSA).....</b>	<b>31</b>
<b>3.11 ANÁLISE FILOGENÉTICA DE GENOMA COMPLETO (ANI, dDDH E TYGS) .....</b>	<b>33</b>
<b>3.12 COMPARAÇÃO GENÔMICA DE CORE E ACCESSORY.....</b>	<b>36</b>

3.13 ANÁLISE DO GENOMA COM ORTHOVENN E KEEG .....	38
3.14 CARACTERIZAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA .....	38
3.15 IDENTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS MOVEIS (MGE) .....	39
<b>4.RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PACIENTE E RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA DA BACTÉRIA.....	40
4.2 SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA .....	41
4.3 GENES ORTOLOGOS COG E GO .....	42
4.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA DE 16S E TESTES BIOQUÍMICOS .....	44
4.5 ANÁLISE DE MLSA, ANI, dDDH E TYGS.....	45
4.6 ANÁLISE COMPARATIVA DE CORE GENÔMICO, ORTHOVENN E KEGG.....	49
4.7 RESISTOMA DA BACTÉRIA .....	52
<b>BOMBA DE EFLUXO MULTI-DROGAS RND PERMEASE ACRB.....</b>	<b>53</b>
4.8 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	55
4.9 ELEMENTOS MOVEIS DA BACTÉRIA.....	56
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>
<b>8. ANEXO 1 .....</b>	<b>86</b>
<b>9.ANEXO 2.....</b>	<b>113</b>

## PRODUTIVIDADE OBTIDA

Os resultados obtidos neste trabalho geraram um artigo científico internacional, no qual sou primeira autora, que foi aceito e está para ser publicado na revista *Microbiology Spectrum*, com fator de impacto 9.043. (**Anexo 1**)

- **Gabriela Guerrera Soares**, Emeline Boni S Campanini , Roumayne Lopes Ferreira , Marcelo Silva Folhas Damas , Saulo Henrique Rodrigues , Leslie Camelo Campos , Jucimária Dantas Galvão , Andrea Soares da Costa Fuentes , Mr. Caio C.M. Freire , Dr. Iran Malavazi , Dr. Andre Pitondo-Silva , Anderson Ferreira da Cunha , Maria Cristina da Silva Pranchevicius. *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov.: a new multidrug-resistant species isolated from a patient in Brazil.

Adicionalmente, publicamos outro artigo internacional na revista *Frontiers in Medicine* (fator de impacto 5.058), no qual eu estou como colaboradora (**Anexo 2**):

- Damas MSF, Ferreira RL, Campanini EB, **Soares GG**, Campos LC, Laprega PM, Soares da Costa A, Freire CCM, Pitondo-Silva A, Cerdeira LT, da Cunha AF, Pranchevicius MDS. Whole genome sequencing of the multidrug-resistant *Chryseobacterium indologenes* isolated from a patient in Brazil. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Jul 28;9:931379. doi: 10.3389/fmed.2022.931379. PMID: 35966843; PMCID: PMC9366087.

## 1. INTRODUÇÃO

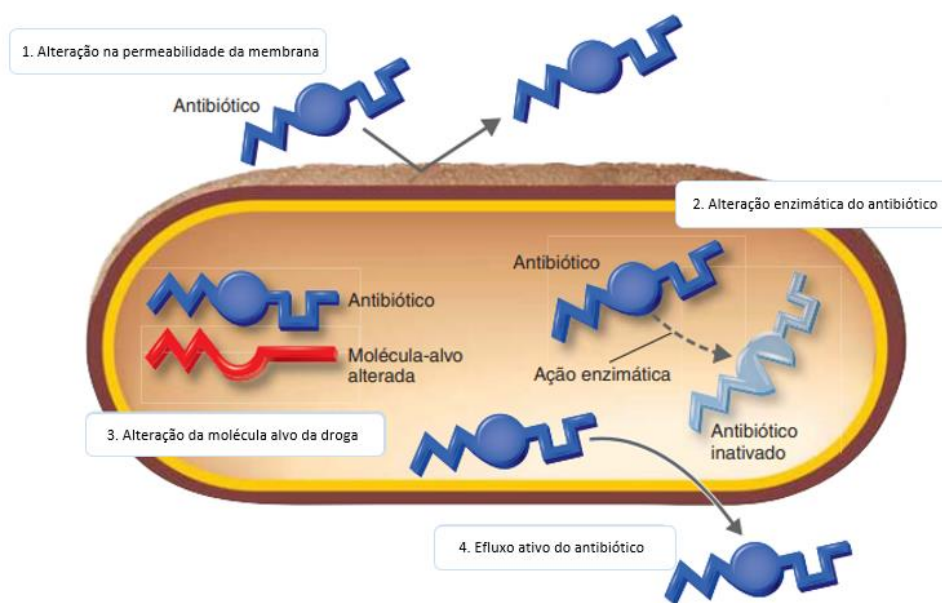
### 1.2 A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência antimicrobiana por definição é a capacidade de um microrganismo de desenvolver a habilidade de resistir a atividade de uma droga, a qual pode inibir o seu crescimento ou levá-lo a morte (VERRAES et al., 2013; FOUNOU et al., 2021).

A resistência a compostos antimicrobianos pode se dar de forma intrínseca ou adquirida. Em bactérias, a resistência intrínseca ocorre quando esses genes estão localizados no cromossomo bacteriano e impossibilitam a ação dos antibióticos (FLORIS, 2020; COX & WRIGHT, 2013). A resistência adquirida é um mecanismo natural que pode ocorrer por mutação espontânea e pela transferência horizontal de material genético (por *transposons*, plasmídeos) (ANDERSON et al., 2019; SAMTIYA et al., 2022; VAN HOEK et al., 2011).

Os sistemas de resistência bacteriana são mecanismos inteligentes usados para escapar dos efeitos das drogas (MADHAV et al., 2020). Existem 4 mecanismos fundamentais de resistência, sendo eles: alteração na permeabilidade da membrana que evita a entrada do

medicamento, alteração de proteínas na bactéria que são alvos de drogas, degradação/inativação enzimática do antibiótico, e o efluxo ativo de uma droga (**Figura 1**) (DEVER & DERMODY, 1991; REYGAERT, 2018; SULTAN, 2018; TORTORA et al., 2016).



**Figura 1.** Mecanismos de resistência antimicrobiana. Figura adaptada de TORTORA et al., 2016.

### 1.2.1 Mecanismos de resistência

A **permeabilidade** seletiva das membranas biológicas permite o controle da entrada de moléculas, controlando e mantendo a composição interna da célula (COOPER & HAUSMAN, 2000). As bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa com alto teor lipídico (apolar), que de forma natural impede a entrada de drogas hidrofílicas ou polares, facilitando a passagem de drogas hidrofóbicas ou apolares (KUMAR & SCHWEIZER, 2005; REYGAERT, 2018). Em gram-negativas com parede celular espessas, as substâncias hidrofílicas entram por canais de porinas; e a produção desses canais pode ser adaptada na presença de antibióticos, reduzindo o número de canais e consequentemente diminuindo a quantidade de antibiótico absorvida pela célula (KUMAR & SCHWEIZER, 2005; CORNAGLIA et al., 1996; REYGAERT, 2018). Essa absorção reduzida fornece resistência a várias classes de antibióticos incluindo trimetoprim, sulfonamidas, aminoglicosídeos, cloranfenicol e quinolonas (DEVER & DERMODY, 1991). As bactérias gram-positivas são capazes de alterar o principal componente lipídico da membrana, diminuindo a permeabilidade a agentes antimicrobianos policatiônicos (EPAND et al., 2016). Outro exemplo encontrado em bactérias é a formação de biofilme, uma matrix exopolissacarídica, para reduzir a penetração e a permeabilidade dos antibióticos (JUBEH et al., 2020).

O mecanismo de **modificação de alvo de drogas** permite resistência para todas as classes de antibióticos, independentemente do mecanismo de ação do antibiótico (LAMBERT, 2005). Esse mecanismo consiste na modificação estrutural de proteínas alvos de antibióticos,

diminuindo ou eliminando a capacidade de interação entre a droga e a proteína da bactéria. Essas modificações podem ocorrer por meio de mutações ou regulação da expressão gênica, diminuindo a concentração de uma proteína alvo (REYGAERT, 2018). Este mecanismo atua de forma variada em bactérias gram negativa e gram positiva, atingindo um espectro amplo de genes e proteínas.

A **inativação de drogas pela bactéria** pode ocorrer por meio da hidrólise do antibiótico ou pela modificação da molécula do antibiótico (SULTAN, 2018; DAVIES, 1994). A hidrólise é um processo que destrói completamente a molécula de antibiótico; já a modificação pode ocorrer por meio da adição de grupos químicos a droga causando inativação enzimática (REYGAERT, 2018). Este é um mecanismo de resistência amplamente utilizado por patógenos gram-negativos e gram-positivos contra antibióticos do tipo aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas) e cloranfenicol (DAVIES, 1994; EL SALABI et al., 2013).

O **efluxo de drogas** é um mecanismo antimicrobiano principalmente encontrado em bactérias gram-negativas (PEARSON et al., 1999; SOTO, 2013; POOLE, 2007; NISHINO et al., 2021). Esse mecanismo é responsável por bombear ativamente solutos para fora da célula, permitindo a regulação do ambiente interno da bactéria, removendo substâncias tóxicas como os antibióticos (SOTO, 2013; POOLE, 2007). Bombas de efluxo são proteínas de membrana conservadas em diversos organismos (NISHINO et al., 2021). Como essas proteínas são muitas vezes inespecíficas, podem reconhecer diversas drogas (SHRIRAM et al., 2018) e estão intimamente relacionadas ao surgimento de bactérias multidrogas resistentes (LORUSSO et al., 2022; NISHINO et al., 2021). Existem 5 superfamílias de bombas de efluxo: a do cassete de ligação de ATP (ABC); facilitadora principal (MFS); extrusão de compostos tóxicos e multidrogas (MATE); de pequena resistência a múltiplas drogas (SMR); resistência-nodulação-divisão (RND); e do transportador de metabólitos de drogas (DMT) (SOTO, 2013; BLAIR et al., 2014; ABDULLAH, 2021). Bactérias gram-negativas clinicamente relevantes comumente apresentam o sistema RND, composto por 3 componentes, sendo eles uma proteína transmembrana na membrana interna, uma proteína periplasmática e uma proteína associada a membrana externa (LORUSSO et al., 2022; SOTO, 2013; BLAIR et al., 2014; LI & NIKAIDO, 2009). Em bactérias gram-positivas os sistemas MFS e ABC são mais frequentemente encontrados (LI & NIKAIDO, 2009; SOTO, 2013).

## 1.2 IMPACTOS DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência antimicrobiana (RAM) apresenta um desafio iminente para a saúde pública global, trazendo uma ameaça a prevenção e ao tratamento eficaz de uma grande variedade de infecções causadas por agentes infecciosos. Desde 1987 não houveram descobertas bem-sucedidas de classes de novos antibióticos, intensificando o problema de resistência as drogas já existentes no mercado (NELSON et al., 2019). Em 2015, Organização Mundial da Saúde publicou um plano de ação global referente a resistência antimicrobiana e nele constatou que o uso extensivo e mau administrado de drogas antimicrobianas na medicina humana e na produção de alimentos colocou em risco o sistema de saúde de todas as nações (WORLD HEALTH ORGANIZATION et al., 2015). Atualmente, a resistência antimicrobiana é responsável por 700.000 mortes anualmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION et al., 2019), e sem ações para combater

esse problema, em 2050 é previsto mais de 10 milhões de mortes por ano, um número muito maior do que pessoas que morreram em 2018 de câncer (O'NEILL et al., 2014).

Portanto, a resistência antimicrobiana apresenta impactos globais multifacetários, na esfera econômica e da saúde pública; e é possível que adentremos uma era pós antibiótica, na qual infecções comuns e ferimentos leves podem levar à morte (REARDON, 2014). Diante dessa realidade é imperativa a necessidade de ações que visem o desenvolvimento de novas terapias eficientes e acessíveis para o tratamento das doenças infecciosas causadas por bactérias multidrogas resistentes.

### 1.3 PRINCIPAIS CLASSES DE ANTIBIÓTICOS E SEUS MECANISMOS DE FUNCIONAMENTO

Antibióticos são compostos sintéticos ou produzidos por organismos vivos que matam ou inibem o crescimento de bactérias (PURSSEL, 2020; PAUTER et al., 2020). Esses compostos destinam-se a tratar diversas doenças bacterianas infecciosas como tuberculose, sífilis, infecções gastrointestinais, pneumonia, bronquite, meningite e septicemia (PAUTER et al., 2020). Os antibióticos são classificados considerando seu espectro de ação e seu mecanismo de ação (THRUM, 1997; KAPOOR et al., 2017). As classes e famílias de antibióticos são apresentadas a seguir, elucidando algumas diferenças no mecanismo de ação.

A família de antibióticos beta-lactâmicos é a maior entre os agentes antimicrobianos, sendo o mais utilizado em tratamentos clínicos para infecções bacterianas (SUAREZ & GUDIOL, 2009). O mecanismo de ação dessa família consiste na inibição da síntese da parede celular bacteriana e é caracterizada pela presença de um anel beta-lactâmico de 3 carbonos e 1 nitrogênio, essencial na atividade desses antimicrobianos (PANDEY & CASCELLA, 2022; DONOWITZ & MANDELL, 1988; MORIN & GORMAN, 2014). Os beta-lactâmicos incluem penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (GALLAGHER & MACDOUGALL, 2022; DONOWITZ & MANDELL, 1988; MORIN & GORMAN, 2014).

As penicilinas contêm um anel beta-lactâmico, e uma cadeia lateral de ácido 6-animopenicilânico (PANDEY & CASCELLA, 2022; MORIN & GORMAN, 2014). Inclui penicilinas naturais (penicilina V e G) (GALLAGHER & MACDOUGALL, 2022), como também agentes resistentes à beta-lactamase (PANDEY & CASCELLA, 2022), carboxipenicilinas (ticarcilina e piperacilina) (ZUCKERMAN, 2009), aminopenicilinas (amoxicilina e ampicilina) e ureidopenicilinas (piperacilina) (WALLER et al., 2021).

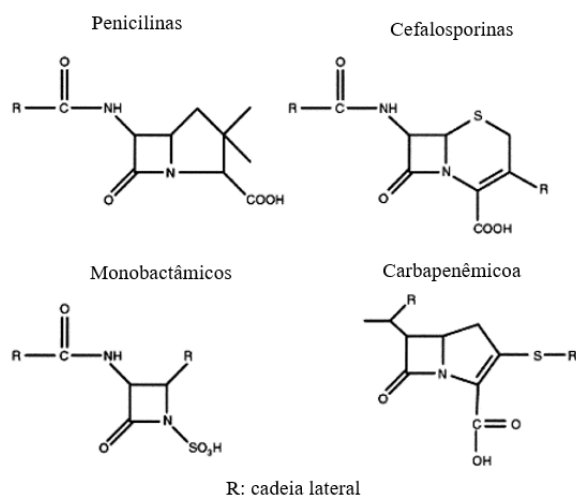
A Ampicilina-Sulbactam e Piperacillin-Tazobactam, é uma combinação de uma penicilina e um inibidor de beta-lactamase. Os inibidores se ligam irreversivelmente as beta-lactamase prevenindo a degradação do beta-lactâmico, tornando mais eficiente o tratamento da doença infecciosa (GALLAGHER & MACDOUGALL, 2022).

Cefalosporinas contêm um núcleo de ácido 7-aminocefalosporânico e são tradicionalmente divididas em cinco classes ou gerações (PANDEY & CASCELLA, 2022). As cefalosporinas de primeira geração incluem agentes como cefazolina, cefalexina e cefadroxil (MAKII et al.,

2022). Cefalosporinas de segunda geração incluem cefuroxima, cefprozil e cefoxitina e as cefalosporinas de terceira geração incluem ceftriaxona, cefotaxima, cefixima, cefdinir e ceftazidima (DAS et al., 2022; MAKII et al., 2022). As cefalosporinas de quarta geração incluem a cefepima e cefpiroma (GARAU et al., 1997). Por fim, cefalosporinas de quinta geração incluem a ceftarolina (MARCDANTE & KLIEGMAN, 2016).

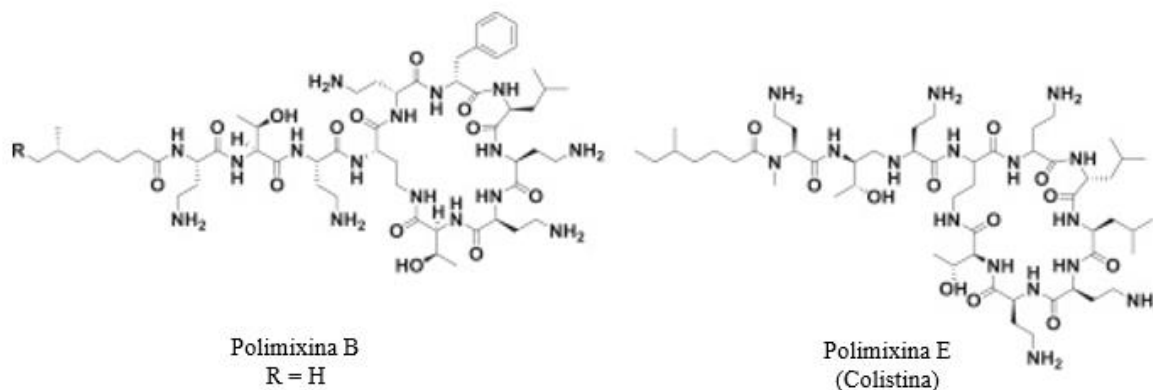
Os monobactâmicos é monocíclico (um anel beta-lactâmico) e caracterizado por conter o grupo 2-oxoazetidina-1-sufônico (PANDEY & CASCELLA, 2022; MORIN & GORMAN, 2014) inclui os seguintes agentes: aztronam e carumonam (VARDANYAN & HRUBY, 2016).

Carbapenêmicos contém um carbapenem acoplado a um anel beta-lactâmico que confere proteção contra a maioria das beta-lactamases (PANDEY & CASCELLA, 2022). Esta classe contém doripenem, ertapenem, imipenem e meropenem (SCHAECHTER, 2009).



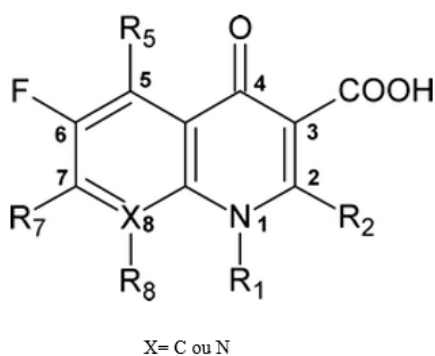
**Figura 2.** Estrutura dos antibióticos beta-lactâmicos. Adaptada de Williams, (1999).

A classe de antibióticos polimixinas são produtos fermentadores de *Bacillus polymyxa*, sendo as mais reconhecidas para uso clínico a polimixina B e a polimixina E, também conhecida como colistina (COHEN et al., 2016; AYOUB MOUBARECK, 2020). O mecanismo de ação das polimixinas consiste em causar danos celulares que levam a morte da bactéria, interrompendo a integridade da membrana (MOHAPATRA et al., 2021; GALLAGHER & MACDOUGALL, 2022). Esse mecanismo se torna um problema por interagir com as células humanas, tornando esse antibiótico altamente tóxico, sendo seu uso recomendado como último recurso (MOHAPATRA et al., 2021; ZAVASCKI et al., 2007).



**Figura 3.** Estruturas da polimixina B e polimixina E (colistina). Adaptada de VARDANYAN & HRYUBY, 2016.

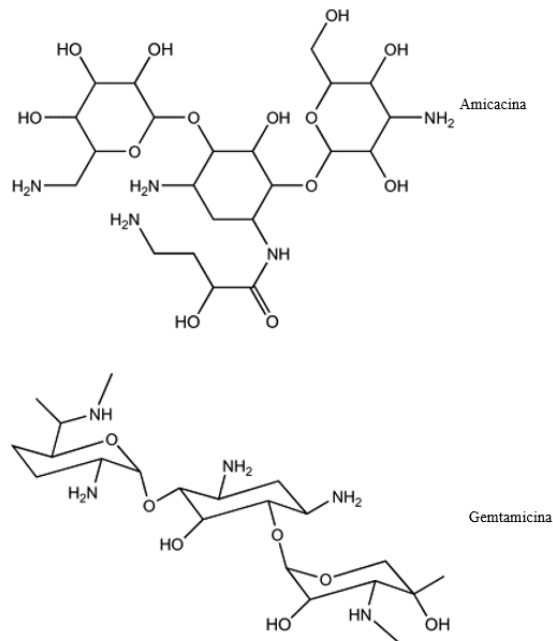
Flouroquinolonas são uma classe importante de antibióticos de amplo espectro, cujo espectro de ação amplia conforme as modificações foram feitas na estrutura da primeira quinolona, o ácido nilidíxico (FÀBREGA et al., 2009). As flouroquinolonas alteram a conformação de duas proteínas essenciais a sobrevivência bacteriana, a DNA girase e a topoisomerase IV, inibindo seu funcionamento e levando o microorganismo a morte (FÀBREGA et al., 2009; DRLICA, 1999). As fluoquinolonas atualmente disponíveis são as ciprofloxacina, levofloxacina, pefloxacina, sitafloxacina, moxifloxacina e ofloxacina (SWALLOW, 2015).



**Figura 4.** Estrutura geral das fluoquinolonas, indicando possíveis modificações estruturais nos radicais R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub> e R<sub>8</sub>. Adaptada de SOUSA et al., 2012.

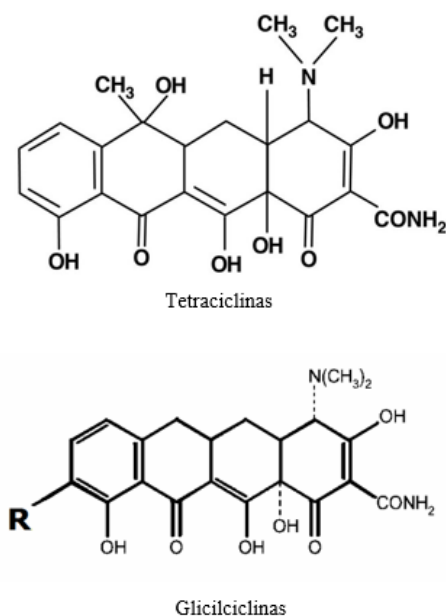
Aminoglicosídeos são agentes antimicrobianos potentes de amplo espectro que agem pelo mecanismo de inibição da síntese proteica (KRAUSE et al., 2016). A ação antimicrobiana ocorre pela ligação do aminoglicosídeo a subunidade ribossomal 30S, interrompendo a síntese de proteínas (FOURMY et al., 1996; MINGEOT-LECLERCQ et al., 1999). Essa classe é composta por açúcares hidrofílicos multifuncionais que possuem diversas funcionalidades de amino e hidróxi (KOTRA et al., 2000). Essa classe de antibióticos inclui neomicina, canamicina, gentamicina, netilmicina, tobramicina, amicacina e estreptomicina (KRAUSE et al., 2016; GERMOVSEK et al., 2017).





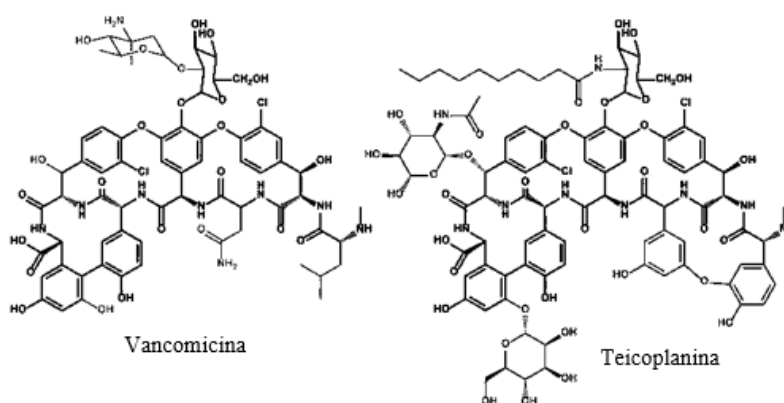
**Figura 5.** Estrutura dos aminoglicosídeos amicacina e gentamicina, principais antibióticos discutidos no trabalho. Adaptada de DASCUPTA, 2012.

As classes de antibióticos Tetraciclina e Gliciliciclina possuem o mesmo mecanismo de ação, se ligando a subunidade ribossomal 30S, prevenindo a ligação do RNA de transferência e interrompendo a adição de novos aminoácidos a cadeia proteica (GALLAGHER & MACDOUGALL, 2022). As gliciliciclina são produtos semissintéticos derivados da tetraciclina (PEREIRA-MAIA et al., 2010) e diferenciam-se por conter uma porção glicilamido ligada a posição 9 do anel tetraciclina (WEXLER, 2015). Os agentes da classe tetraciclina são tetraciclina, doxiciclina, minociclina, tigeciclina (SHUTTER & AKHONDI, 2022). A classe gliciliciclina possui o fármaco tigeciclina que possui um amplo espectro de atividade antimicrobiana (GREER, 2006).



**Figura 6.** Estruturas gerais das Tetraciclina e Glicilciclinas. Adaptada de ROSSI & ANDREAZZI, 2006 e KWIATKOWSKA et al., 2013.

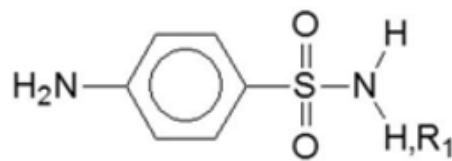
Os glicopeptídeos são um grupo natural e semissintético de peptídeos glicosilados (ZENG et al., 2016) que inibem um estágio tardio da formação do peptídeoglicano da parede celular bacteriana (REYNOLDS, 1989). A vancomicina e a teicoplanina fazem parte da primeira geração de glicopeptídeos clinicamente importante, sendo utilizados como último recurso para o tratamento de infecções causadas por patógenos infecciosos (BINDA et al., 2014).



**Figura 7.** Estrutura da vancomicina e da teicoplanina. Adaptada de TAO et al., 2021.

As sulfonamidas são antibióticos sintéticos derivados da sulfanilamida utilizados como amplo espectro para tratamento clínico de humanos e animais (OVUNG & BHATTACHARYYA, 2021; GARCÍA-GALÁN et al., 2008). Essa classe é caracterizada por uma estrutura contendo uma porção de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) (ARONSON, 2015). O mecanismo de ação das sulfonamidas consiste em inibir a produção de ácido fólico, composto essencial para

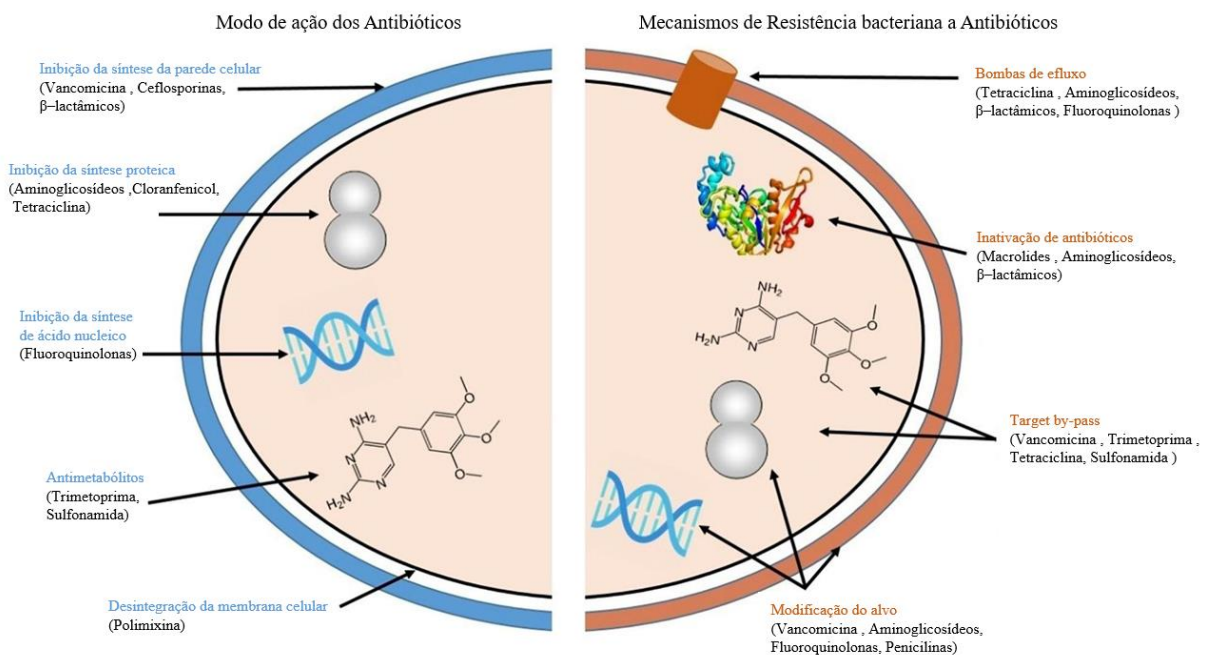
sobrevivência bacteriana (GARCÍA-GALÁN et al., 2008; PÉREZ-TRALLERO & IGLESIAS, 2003). As sulfonamidas utilizadas clinicamente contra doenças infecciosas são sulfonilamida, sulfapiridina, sulfatiazole, sulfamehoxazol, sulfamerazina, sulfadiazina, sulfabromometazina, sulfametoxipiridazina, sulfacloropiridazina, sulfametazina, sulfaetoxipiridazina e sulfadimetoxina (CHRISTENSEN, 2021).



R1= heterociclo aromático

**Figura 8.** Estrutura dos antibióticos sulfonamidas. Adaptada de MARTUCCI et al., 2014

Na **figura 9** temos representados os mecanimos de ação dos antibióticos relacionados com os mecanimos de resistência antimicrobiana.



**Figura 9.** Modo de ação dos antibióticos e mecanismo de resistência bacteriana a antibióticos. Target by-pass é um mecanismo de resistência antimicrobiana que consiste em criação de novas vias para contornar a enzima alvo do antibiótico (ULUSEKER et al., 2021). Adaptada de ULUSEKER et al., 2021.

## 1.4 GÊNERO BREVUNDIMONAS

Bactérias gram-negativas não fermentadoras são uma preocupação emergente em locais clínicos, sendo uma causa comum de infecções nosocomiais. O gênero *Brevundimonas* foi descrito pela primeira vez em 1994 por Segers (SEGERS et al., 1994), e incorporou as bactérias *Pseudomonas diminuta* e *Pseudomonas vesicularis* (RYAN & PEMBROKE, 2018). As cepas de *Brevundimonas* são bactérias gram-negativas que se apresentam como bastonetes retos finos, não formam esporos, são aeróbicos, não fermentadores de glicose e são positivas para oxidase (LIU et al., 2021). Estas bactérias apresentam resultados variáveis para catalase, mas normalmente apresentam-se como catalase positiva, sendo a temperatura ideal para crescimento entre 30-37°C (LIU et al., 2021). As *Brevundimonas* spp. possuem alta composição de bases G+C em seu genoma, em torno de 60,8 mol% - 70,4 mol% (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>), e apresentam pequeno flagelo polar quando móveis (RYAN & PEMBROKE, 2018). Como características quimiotaxonômicas referente ao seu metabolismo, essas bactérias apresentam Q-10 como quinona isoprenóide principal; e C<sub>18:1w7c</sub> e C<sub>16:0</sub> como principais ácidos graxos (WANG et al., 2012).

No âmbito biotecnológico, as *Brevundimonas* têm aplicações como a biossorção de cádmio (MASOUDZADEH et al., 2011), biorremediação do solo (ZHANG et al., 2021), tratamento de poluentes da água (WANG et al., 2015) e promoção do crescimento de plantas para a agricultura sustentável em regiões áridas (KUMAR & GERA, 2014). As bactérias do gênero *Brevundimonas* podem ser isoladas de solos (HANDSCHUH et al., 2017; WANG et al., 2012), sedimento de fundo submarino (TSUBOUCHI et al., 2014, TSUBOUCHI et al., 2013), iodo ativado (RYU et al., 2007), numerosos habitats aquáticos (ABRAHAM et al., 2010), água purificada (PENNA et al., 2002) e, em algumas ocasiões, infecções humanas (CHI et al., 2004; OTTO et al., 1987).

Atualmente, existem 34 espécies com publicações validadas dentro do gênero *Brevundimonas* (<http://www.bacterio.net/brevundimonas.html>). *Brevundimonas vesicularis* e *Brevundimonas diminuta* são as duas *Brevundimonas* mais frequentemente isoladas em infecções humanas (CHI et al., 2004; OTTO et al., 1987). Em humanos, essas bactérias são patógenas oportunistas e podem causar vários tipos de infecções, como bacteremia, infecção ocular, peritonite, infecção do trato urinário e infecção de pele e tecidos moles (RYAN & PEMBROKE, 2018). No entanto, essas bactérias permanecem pouco estudadas (LIU et al., 2021).

### 1.4.1 *Brevundimonas vesiculares*

A *Brevundimonas vesicularis* é um microrganismo isolado em ambientes naturais, tais como água, solo, plantas e pode também ser encontrados em amostras clínicas de pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes (SHANG et al., 2012; VAHID, 2005; CHI et al., 2004). As infecções causadas por essas bactérias podem acometer pacientes sofrendo de leucemia, anemia falciforme, pancreatite biliar, doença renal terminal, lúpus eritematosos sistêmicos, anemia falciforme, malignidade hematológica, neutropenia (SHANG et al., 2012; CHANDRA et al., 2010; VAHID, 2005; OBERHELMAN et al., 1994), os que sofreram terapia prolongada com esteroides, ou após procedimentos cirúrgicos (GILAD et al., 2000; PELLETIER et al., 2010). *B. vesicularis* pode também causar endocardite (YANG et al., 2006),

artrite (SOFFER et al., 2010), ceratite (PELLETIER et al., 2010), infecção do trato urinário (GUPTA et al., 2014A), abscesso hepático (YOO et al., 2012) e bacteriemia/septicemia (GOMBAČ et al., 2016; KARADAG et al., 2012; CHANDRA et al., 2010). Em humanos, *B. vesicularis* é uma bactéria oportunista que foi isolada de sangue, líquido cefalorraquidiano, urina, olhos, feridas e culturas vaginais (VAHID, 2005). O modo exato de transmissão de *B. vesicularis* ainda não foi totalmente esclarecido, mas, sendo uma bactéria não fermentadora, esta pode sobreviver em ambientes úmidos e objetos inanimados em ambiente hospitalar (KARADAG et al., 2012).

#### 1.4.2 *Brevundimonas diminuta*

Existem poucos relatos na literatura sobre infecções humanas causadas por *Brevundimonas diminuta*, no entanto, essas são encontradas em pacientes imunocomprometidos e os fatores que os predispõem a essas infecções permanecem desconhecidos (CAO et al., 2015). *B. diminuta* em humanos são consideradas principalmente como organismos oportunistas e há relatos de sua presença principalmente em pacientes com câncer, fibrose cística, com cateter vascular de demora, síndrome nefrótica (CHANDRA et al., 2017). As bactérias *B. diminuta* isoladas comumente provém de amostras de sangue humano (HAN & ANDRADE, 2005; CHI et al., 2004), escarro, (MENUET et al., 2008), urina (HAN & ANDRADE, 2005), empiema, (HAN & ANDRADE, 2005) espécimes de biópsia (ALMUZARA et al., 2012), úlcera de córnea (PANDIT, 2012), coto umbilical (LUPANDE-MWENEBITU et al., 2021) e fluido pleural (LU et al., 2013).

#### 1.5 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DE GENOMA - WGS

O sequenciamento do genoma completo (WGS) revolucionou os estudos da microbiologia clínica por estar se tornando mais acessível economicamente e é de rápido resultado (MORAN-GILAD, 2017). Além disso, essa técnica fornece abundante informação dos genes presentes no patógeno (ZANKARI et al., 2013; ZHOU et al., 2010; SCHWARZE et al., 2018). No caso de bactérias incluem resistência a antibióticos, epidemiologia molecular e virulência (GAUTAM et al., 2019), entre outras.

WGS é também considerado uma inovação com potencial para a vigilância epidemiológica, análises de surtos hospitalares, controle de infecções e diagnóstico clínico mais eficiente (QUAINOO et al., 2017; ZANKARI et al., 2013). Portanto, o sequenciamento completo está se tornando uma técnica amplamente utilizada em pesquisas, diagnóstico clínico e laboratórios de saúde pública (GAUTAM et al., 2019). Análises feitas por WGS também podem fornecer um *insight* na evolução e na fisiologia de um microrganismo clinicamente relevante (SNITKIN et al., 2013; ALLARD, 2016), por meio da comparação do seu genoma com o de seus ancestrais e seus semelhantes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as características fenotípicas e genotípicas (através do sequenciamento completo, WGS) de uma cepa de *Brevundimonas* sp. isolada do Líquido Cefalorraquiano (LCR) de uma paciente, hospitalizada na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do Hospital Geral de Palmas (HGP) em Tocantins.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar as características fenotípicas de uma cepa *Brevundimonas* sp.

Realizar o sequenciamento a montagem e a anotação do genoma da *Brevundimonas*.

Analisar as categorias funcionais *in silico* por meio das ferramentas EGGnog e Blast2Go.

Analisar a filogenia através de 16S ribossomal da cepa com outras *Brevundimonas* sp.

Realizar testes bioquímicos e comparação de cepas *Brevundimonas* para diferenciação da espécie.

Identificação de espécie *in silico* através de MLSA, ANI, DDH e TYGS.

Identificar e comparar *in silico* o genoma *core* e *accessory* da cepa com outras *Brevundimonas* sp. utilizando a ferramenta Roary pipeline.

Realizar uma análise *in silico* comparativa entre a cepa e as *Brevundimonas* sp., identificando características em comum e únicas através das ferramentas Keeg e Orthovenn.

Analisar os genes de resistência a antibióticos e os de virulência através de análises *in silico* utilizando diversos bancos de dados de genes de resistência disponíveis *online*.

Utilizar os servidores ICEfinder, ISfinder, TnCentral, MGEfinder, PHAST e CRISPRfinder para identificar *in silico* os elementos móveis no genoma da cepa.

Relacionar os elementos móveis identificados *in silico* com os fatores de virulência e resistência encontrados na cepa.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa está seguindo os preceitos da Resolução 196/96 16 do CNS, considerando que foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com o parecer n. 1.088.936 de 9 09/06/2015. O acesso ao patrimônio genético e transporte foi aprovado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen n° AFF27ED). Foram utilizadas as fichas do LACEN-TO para obtenção de dados como idade, sexo e tipo de amostra biológica que serviu para entendermos as características do perfil de resistência bacteriano. Em nenhum momento, houve qualquer tipo de contato dos pesquisadores com o paciente e o nome que se encontra na ficha do LACEN-TO será mantido em sigilo absoluto.

#### 3.2 INFORMAÇÃO E ISOLAMENTO DA CEPA

Uma amostra de *Brevundimonas* foi isolada do Líquido Cefalorraquiano (LCR) de um paciente, do sexo feminino, com 5 meses de idade, que se encontrava na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do Hospital Geral de Palmas (HGP), Tocantins. A amostra foi inicialmente identificada pelo laboratório de microbiologia do HGP e, posteriormente, foi enviada ao Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Tocantins (LACEN-TO) para uma identificação mais precisa e realização de novas análises sobre a susceptibilidade aos antibióticos.

#### 3.3 SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

No laboratório de Bacteriologia/Biologia Médica do LACEN-TO a pesquisadora Roumayne Lopes Ferreira, através do sistema de automação-VITEK-2, realizou os testes de suscetibilidade frente a 16 antibióticos: ampicilina (AMP), ampicilina/sulbactam (SAM), piperacilina/tazobactam (TZP), cefuroxime (CXM), cefoxitina (FOX), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO), cefepime (FEP), ertapenem (ETP), imipenem (IPM), meropenem (MEM), amikacin (AMK), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), tigeciclina (TGC), e colistina (CST). Foi utilizado o método de microdiluição em caldo (BMD) de acordo com as recomendações EUCAST (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, 2021) para determinar a concentração inibitória (MICs) de colistina e tigeciclina. Por fim, os resultados obtidos pelo sistema de automação-VITEK-2 foram comparados aos obtidos pelo método BMD. A identificação da espécie pelo VITEK-2 não foi conclusiva.

A caracterização fenotípica para carbapenemases foi efetuada pelo teste de Hodge modificado, teste de sinergia, e o teste do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a rotina pré-estabelecida na Instituição, que seguem as

recomendações padronizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021) vigente e orientações técnicas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. A caracterização da bactéria como *Brevundimonas* multidroga-resistente (MDR) foi definida pela não susceptibilidade a pelo menos um agente dentro de três ou mais categorias de antibióticos (MAGIORAKOS et al., 2012).

### 3.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico da cepa *Brevundimonas* foi extraído, pela pesquisadora Roumayne Lopes Ferreira, da cultura usando o Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard (Promega). A concentração do extrato de DNA e pureza foi determinada medindo a absorbância nos comprimentos de onda 260 e 280 nm (NanoVue Plus - GE Healthcare Life Sciences). A integridade do DNA genômico foi testada por eletroforese em gel de agarose a 1,0%.

### 3.5 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO

O sequenciamento do genoma completo do isolado *Brevundimonas* sp. foi realizado pela Professora Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UFSCar-DGE, utilizando a plataforma Illumina NextSeq 550 System Sequencing. O DNA genômico do organismo foi extraído utilizando o Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. A concentração do DNA bacteriano foi determinada utilizando o equipamento Qubit® 3.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para o sequenciamento foi feita a preparação da biblioteca gênica com o kit Nextera XT DNA Library Prep (Illumina, San Diego, CA, USA) utilizando 1 ng de DNA genômico. A biblioteca foi amplificada utilizando um programa de PCR com ciclos limitados. Os passos para a PCR incluem adicionar os adaptadores Index 1 (i7) e Index 2 (i5) e sequências necessárias para formar o cluster. A purificação da biblioteca foi realizada utilizando esferas magnéticas 0.6x Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter). A quantificação e verificação dos tamanhos dos fragmentos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5%. A quantificação final da biblioteca foi feita em fluorímetro Qubit® 3.0 e normalizada a 4nM utilizando um método de diluição padrão. As bibliotecas foram misturadas, desnaturadas com 0,2 N NaOH e diluídas a uma concentração final de 1,8pM. Um controle PhiX foi adicionado na concentração final de 1,5pM. A corrida durou 75 ciclos para cada leitura (2x75).

### 3.6 MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA

O sequenciamento foi analisado com o programa FastQC e foi utilizado o programa Trimgalore para fazer a trimagem de bases e melhorar a qualidade do sequenciamento. A montagem do genoma foi feita com o programa SPAdes 3.2 (BANKEVICH et al., 2012) e as estatísticas da montagem foram acessadas com o programa QUAST (GUREVICH et al., 2013). O gráfico do



mapa circular foi obtido usando o servidor CGView (GRANT & STOTHARD, 2008) (<https://cgview.ca/>). Para a identificação e montagem de plasmídeos foi utilizado o plasmidSPAdes (<http://spades.bioinf.spbau.ru/plasmidSPAdes>) (ANTIPOV et al., 2016). O genoma da cepa *Brevundimonas* sp. foi anotado usando o programa de anotação rápida do genoma procariótico, PROKKA (SEEMANN et al., 2014) e o servidor *Rapid Annotation using Subsystem Technology* RAST (AZIZ et al., 2008) (<https://rast.nmpdr.org/>). O programa BUSCO foi utilizado para a avaliação quantitativa da composição genômica e integridade da anotação (SIMÃO et al., 2015), descartando dessa forma os *contigs* de 200 pb ou menores. Essa etapa foi realizada com o auxílio da Dra. Emeline Boni Campanini.

### 3.7 GENES COG, EGGNOG E GO

As categorias funcionais COG (*Clusters of Orthologous Group*) foram atribuídas aos genes da *Brevundimonas* sp. através de pesquisas contra bancos de dados de genes ortólogos. Para a anotação funcional foi utilizado o servidor online EggNOG-mapper (CANTALAPIEDRA et al., 2021) (<http://eggno-mapper.embl.de.>). O programa Blast2GO foi utilizado para analisar as anotações genômica funcional, processos biológicos e os componentes celulares da cepa isolada (CONESA et al., 2008).

### 3.8 ANÁLISE FILOGENÉTICA DO 16S RRNA

Todas as sequências curadas do gene 16S rRNA dos principais membros filogenéticos do gênero *Brevundimonas* foram buscadas no banco de dados GenBank (**Tabela 1**), e juntamente com a sequência de 16S rRNA da cepa isolada de *Brevundimonas* sp., foram alinhadas usando o servidor online MAFFT “*multiple sequence alignment software*” (KATO et al., 2013) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>). A construção da árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) e a seleção do melhor modelo de montagem foram feitas usando o programa PhyML (GUINDON et al., 2009) e o JModelTest (POSADA et al., 2008) para gerar o melhor modelo evolutivo para árvore.

**Tabela 1.** Sequências 16S rRNA utilizadas para montar a árvore filogenética de análise do 16S rRNA.

Cepas de <i>Brevundimonas</i>	Sequencia referência do NCBI	Tamanho (pares de base, pb)
<i>Brevundimonas subvibrioides</i> ATCC 15264	NR_074136.1	1449 bp
<i>Brevundimonas viscosa</i> strain F3	NR_117900.2	1422 bp
<i>Brevundimonas olei</i> strain MJ15	NR_117268.1	1401 bp
<i>Brevundimonas diminuta</i> ATCC 11568	NR_117188.1	1334 bp
<i>Brevundimonas balnearis</i> strain FDRGB2b	NR_156861.1	1399 bp

<i>Brevundimonas canariensis</i> strain GTAE24	NR_156857.1	1431 bp
<i>Brevundimonas albigilva</i> strain NHI-13	NR_148791.1	1442 bp
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> strain BIO-TAS2-2	NR_116722.1	1418 bp
<i>Brevundimonas basaltis</i> strain J22	NR_116194.1	1339 bp
<i>Brevundimonas staleyi</i> strain FWC43	NR_114710.1	1416 bp
<i>Brevundimonas poindexterae</i> strain FWC40	NR_114709.1	1418 bp
<i>Brevundimonas abyssalis</i> TAR-001	NR_114308.1	1406 bp
<i>Brevundimonas aveniformis</i> strain EMB102	NR_043770.1	1403 bp
<i>Brevundimonas subvibrioides</i> ATCC 15264 strain CB81	NR_037107.1	1416 bp
<i>Brevundimonas faecalis</i> strain CS20.3	NR_117187.1	1323 bp
<i>Brevundimonas subvibrioides</i> ATCC 15264	NR_112028.1	1239 bp
<i>Brevundimonas diminuta</i> ATCC 11568	NR_040805.1	1452 bp
<i>Brevundimonas lutea</i> strain NS26	NR_171448.1	1389 bp
<i>Brevundimonas humi</i> strain CA-15	NR_159912.1	1409 bp
<i>Brevundimonas denitrificans</i> strain TAR-002	NR_133989.1	1385 bp
<i>Brevundimonas lenta</i> strain DS-18	NR_044186.1	1418 bp
<i>Brevundimonas terrae</i> strain KSL-145	NR_043726.1	1418 bp
<i>Brevundimonas kwangchunensis</i> strain KSL-102	NR_043315.1	1416 bp
<i>Brevundimonas intermedia</i> strain CIP 106444	NR_116137.1	1260 bp
<i>Brevundimonas vesicularis</i> strain CIP 101035	NR_116136.1	1260 bp
<i>Brevundimonas bacteroides</i> strain CIP 101031	NR_116135.1	1260 bp
<i>Brevundimonas diminuta</i> strain LMG 2089	NR_114708.1	1418 bp
<i>Brevundimonas intermedia</i> strain ATCC 15262	NR_041966.1	1416 bp
<i>Brevundimonas alba</i> strain DSM 4736	NR_041965.1	1417 bp
<i>Brevundimonas mediterranea</i> strain V4.BO.10	NR_037108.1	1416 bp
<i>Brevundimonas variabilis</i> strain CB17	NR_037106.1	1416 bp
<i>Brevundimonas bacteroides</i> strain CB7	NR_037105.1	1416 bp
<i>Brevundimonas vesicularis</i> strain Busing	NR_037104.1	1416 bp

<i>Brevundimonas aurantiaca</i> strain CB-R	NR_028889.1	1416 bp
<i>Brevundimonas nasdae</i> strain W1-2B	NR_028633.1	1427 bp
<i>Brevundimonas halotolerans</i> strain MCS24	NR_118765.1	1292 bp
<i>Brevundimonas subvibrioides</i> strain NBRC 16000	NR_113834.1	1386 bp
<i>Brevundimonas bullata</i> strain NBRC 13290	NR_113611.1	1389 bp
<i>Brevundimonas diminuta</i> strain NBRC 12697	NR_113602.1	1388 bp
<i>Brevundimonas vesicularis</i> strain NBRC 12165	NR_113586.1	1386 bp
<i>Brevundimonas diminuta</i> strain JCM 2788	NR_113238.1	1385 bp
<i>Brevundimonas vesicularis</i> strain IAM 12105	NR_112078.1	1450 bp
<i>Brevundimonas bacteroides</i> strain ATCC 15254	NR_112031.1	1214 bp
<i>Brevundimonas bullata</i> strain IAM 13153	NR_025831.1	1415 bp
<i>Brevundimonas</i> sp. (Cepa do estudo)	-	1459 bp
<i>Henriciella pelagia</i> strain LA220	NR_157792.1	1442 bp

---

### 3.9 TESTES BIOQUÍMICOS

As provas bioquímicas com a *Brevundimonas* sp. foram realizadas por Saulo Henrique Rodrigues, com o Kit de Enterobactérias e os Sistemas Bactray 2 e 3 (Laborclin, Brasil), seguindo a metodologia do fabricante. Os testes bioquímicos com o Kit de Enterobactérias incluíram desaminação do L-Triptofano, fermentação da glicose, produção de gás a partir da glicose, produção de gás sulfídrico, hidrólise da uréia, descarboxilação da lisina, descarboxilação da ornitina, motilidade, indol, ramnose, citrato. Os testes bioquímicos Bactray 2 incluiu malonato, ramnose, adonitol, arabinose, salicina, inositol, sorbitol, sacarose, manitol, rafinose. Os testes Bactray 3 continha cetrimide, acetamide, malonato, citrato, maltose, esculina, controle de arginina, arginina, uréia, triptona.

### 3.10 ANÁLISE DE SEQUÊNCIA MULTILOCUS (MLSA)

A análise de sequência da *Brevundimonas* sp. *multilocus* (MLSA) foi realizada com e 5 genes *housekeeping* – *atpD* (subunidade beta da ATP sintase), *ileS* (isoleucina-tRNA ligase), *recA* (proteína RecA), *rpoC* (subunidade beta de RNA polimerase dirigida por DNA) e *trpB* (cadeia beta da triptofano sintase), que foram recuperados de espécies de *Brevundimonas* referências e de genoma completo do NCBI (National Center for Biotechnology Information)

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e que estão representadas na **Tabela 2**. Os genes foram alinhados pelo servidor MAFFT (KATO et al., 2013) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>) e concatenados na seguinte ordem: *atpD*, *recA*, *ileS*, *rpoC* e *trpB*. A árvore foi contruída com o programa PhyML (GUINDON et al., 2009) com base no melhor modelo escolhido pelo JModelTest (POSADA et al., 2008).

**Tabela 2.** *Brevundimonas* ssp. utilizadas na análise de MLSA juntamente com seu número de acesso e tipo de anotação.

Espécies	Número de acesso	Tipo de anotação
<i>Brevundimonas abyssalis</i> TAR-001*	GCF_000466985.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas alba</i> DSM 4736*	GCF_011927945.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas aurantiaca</i> FXH-172*	GCF_020782355.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas albigilva</i> T7	GCF_023573565.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas aveniformis</i> DSM 17977*	GCF_000428765.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas bacteroides</i> DSM 4726*	GCF_000701445.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas basaltis</i> DSM 25335*	GCF_014202075.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas bullata</i> HAMBI_262*	GCF_003350205.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas diminuta</i> ATCC(B) 19146	GCF_004102925.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas diminuta</i> FDAARGOS_1026	GCF_016127655.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas diminuta</i> NCTC8545*	GCF_900445995.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas fluminis</i> LA-55*	GCF_003934285.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas goettingensis</i> LVF2*	GCF_017487405.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas halotolerans</i> MCS24*	GCF_003730275.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas huaxiensis</i> 090558*	GCF_014218725.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas intermedia</i> B-10	GCF_004614235.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas lenta</i> DSM 23960*	GCF_014196335.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas lutea</i> NS26*	GCF_003704105.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas mediterranea</i> D151-2-6	GCF_011064825.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas mediterranea</i> DSM 14878 *	GCF_014196125.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas naejangsansensis</i> B1	GCF_000635915.2	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas naejangsansensis</i> BRV3	GCF_003627995.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas naejangsansensis</i> DSM 23858*	GCF_000421705.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas naejangsansensis</i> FS1091	GCF_004421065.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas nasdae</i> A30	GCF_019395165.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas nasdae</i> Au29*	GCF_019395145.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas pishanensis</i> CHPC 1.3453*	GCF_022750635.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas pondensis</i> LVF1*	GCF_020524625.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas poindexteriae</i> EaN21-13*	GCF_017487345.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas</i> sp. AJA228-03	GCF_017795885.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas</i> sp. SSC2	GCA_013693835.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas</i> sp. Bb-A	GCF_009394735.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas</i> sp. CS1	GCF_017086445.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas</i> sp. M20	GCF_006547065.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas</i> sp. MF30-B	GCF_004683885.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas</i> sp. PAMC22021	GCF_019443405.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas</i> sp. 'scallop'	GCF_011045535.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas</i> sp. SGAir0440	GCF_005484585.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas terrae</i> DSM 17329*	GCF_011761985.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas vancouverii</i> NCTC9239	GCF_901421975.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas variabilis</i> DSM 4737*	GCF_014199945.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas vesicularis</i> FDAARGOS 289*	GCF_002208825.2	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas viscosa</i> CGMCC 1.10683*	GCF_900116065.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
<i>Brevundimonas vitisensis</i> GR-TSA-9*	GCF_016656965.1	NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)

\*Genomas referências de *Brevundimonas*

### 3.11 ANÁLISE FILOGENÉTICA DE GENOMA COMPLETO (ANI, DDDH E TYGS)

Genomas referências e completos de espécies de *Brevundimonas* foram resgatados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (**Tabela 3**). A Média Identidade de Nucleotídeo (ANI) desses genomas contra o isolado *Brevundimonas* sp. foi calculada usando o algoritmo OrthoANI (YOON et al., 2017) (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>). A hibridização digital DNA-DNA (dDDH) da cepa isolada *Brevundimonas* sp. contra as *Brevundimonas* escolhidas foi calculada *in silico* pela Calculadora de Distância Genoma a Genoma (GGDC 3.0) usando o método de BLAST (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013) (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#>). A ferramenta online CIMminer (<https://discover.nci.nih.gov/cimminer/oneMatrix.do>) do NCBI foi utilizada para construir um *Heatmap* com os resultados do orthoANI e do dDDH. Para inferência filogenética da cepa *Brevundimonas* sp. foi utilizado o servidor TYGS (Type (Strain) Genome Server) (MEIER-KOLTHOFF et al., 2022) (<https://tygs.dsmz.de> acessado em 01 agosto de 2022) contra genomas de referência do gênero *Brevundimonas* (**Tabela 3**). O programa usa fórmula de distância d4 para calcular uma similaridade com base na identidade de sequência (MEIER-KOLTHOFF et al., 2019).

**Tabela 3.** *Brevundimonas* ssp. utilizadas na análise de cálculo de ANI e dDDH com seus respectivos números de acesso.

Espécies	Número de acesso NCBI
<i>Brevundimonas abyssalis</i> TAR-001*	GCF_000466985.1
<i>Brevundimonas alba</i> DSM 4736*	GCF_011927945.1
<i>Brevundimonas aurantiaca</i> FXH-172*	GCF_020782355.1
<i>Brevundimonas albigilva</i> T7	GCF_023573565.1
<i>Brevundimonas aveniformis</i> DSM 17977*	GCF_000428765.1
<i>Brevundimonas bacteroides</i> DSM 4726*	GCF_000701445.1
<i>Brevundimonas basaltis</i> DSM 25335*	GCF_014202075.1
<i>Brevundimonas bullata</i> HAMBI_262*	GCF_003350205.1
<i>Brevundimonas diminuta</i> ATCC(B) 19146	GCF_004102925.1
<i>Brevundimonas diminuta</i> FDAARGOS_1026	GCF_016127655.1
<i>Brevundimonas diminuta</i> KX-1	GCF_022654015.1
<i>Brevundimonas diminuta</i> NCTC8545*	GCF_900445995.1
<i>Brevundimonas fluminis</i> LA-55*	GCF_003934285.1
<i>Brevundimonas goettingensis</i> LVF2*	GCF_017487405.1

<i>Brevundimonas halotolerans</i> MCS24*	GCF_003730275.1
<i>Brevundimonas huaxiensis</i> 090558*	GCF_014218725.1
<i>Brevundimonas intermedia</i> B-10	GCF_004614235.1
<i>Brevundimonas lenta</i> DSM 23960*	GCF_014196335.1
<i>Brevundimonas lutea</i> NS26*	GCF_003704105.1
<i>Brevundimonas mediterranea</i> D151-2-6	GCF_011064825.1
<i>Brevundimonas mediterranea</i> DSM 14878 *	GCF_014196125.1
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> B1	GCF_000635915.2
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> BRV3	GCF_003627995.1
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> DSM 23858*	GCF_000421705.1
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> FS1091	GCF_004421065.1
<i>Brevundimonas nasdae</i> A30	GCF_019395165.1
<i>Brevundimonas nasdae</i> Au29*	GCF_019395145.1
<i>Brevundimonas pishanensis</i> CHPC 1.3453*	GCF_022750635.1
<i>Brevundimonas pondensis</i> LVF1*	GCF_020524625.1
<i>Brevundimonas poindexterae</i> EaN21-13*	GCF_017487345.1
<i>Brevundimonas</i> sp. AJA228-03	GCF_017795885.1
<i>Brevundimonas</i> sp. SSC2	GCA_013693835.1
<i>Brevundimonas</i> sp. Bb-A	GCF_009394735.1
<i>Brevundimonas</i> sp. CS1	GCF_017086445.1
<i>Brevundimonas</i> sp. DS20	GCF_001310255.1
<i>Brevundimonas</i> sp. GW460-12-10-14-LB2	GCF_001636925.1
<i>Brevundimonas</i> sp. LM2	GCF_002002865.1
<i>Brevundimonas</i> sp. M20	GCF_006547065.1
<i>Brevundimonas</i> sp. MF30-B	GCF_004683885.1
<i>Brevundimonas</i> sp. PAMC22021	GCF_019443405.1
<i>Brevundimonas</i> sp. 'scallop'	GCF_011045535.1
<i>Brevundimonas</i> sp. SGAir0440	GCF_005484585.1

<i>Brevundimonas subvibrioides</i> ATCC 15264*	GCF_000144605.1
<i>Brevundimonas terrae</i> DSM 17329*	GCF_011761985.1
<i>Brevundimonas vancanneytii</i> NCTC9239	GCF_901421975.1
<i>Brevundimonas variabilis</i> DSM 4737*	GCF_014199945.1
<i>Brevundimonas vesicularis</i> FDAARGOS 289*	GCF_002208825.2
<i>Brevundimonas viscosa</i> CGMCC 1.10683*	GCF_900116065.1
<i>Brevundimonas vitisensis</i> GR-TSA-9*	GCF_016656965.1

\*Genomas referências de *Brevundimonas*

**Tabela 4.** Genomas referências utilizados na análise TYGS e seus devidos números de acesso.

Espécies	Número de acesso NCBI
<i>Brevundimonas abyssalis</i> TAR-001	GCF_000466985.1
<i>Brevundimonas alba</i> DSM 4736	GCF_011927945.1
<i>Brevundimonas aurantiaca</i> FXH-172	GCF_020782355.1
<i>Brevundimonas bacteroides</i> DSM 4726	GCF_000701445.1
<i>Brevundimonas basaltis</i> DSM 25335	GCF_014202075.1
<i>Brevundimonas bullata</i> HAMB1_262	GCF_003350205.1
<i>Brevundimonas diminuta</i> NCTC8545	GCF_900445995.1
<i>Brevundimonas fluminis</i> LA-55	GCF_003934285.1
<i>Brevundimonas goettingensis</i> LVF2	GCF_017487405.1
<i>Brevundimonas huaxiensis</i> 090558	GCF_014218725.1
<i>Brevundimonas lenta</i> DSM 23960	GCF_014196335.1
<i>Brevundimonas lutea</i> NS26	GCF_003704105.1
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> DSM 23858	GCF_000421705.1
<i>Brevundimonas nasdae</i> Au29	GCF_019395145.1
<i>Brevundimonas pishanensis</i> CHPC 1.3453	GCF_022750635.1
<i>Brevundimonas subvibrioides</i> ATCC 15264	GCF_000144605.1
<i>Brevundimonas vesicularis</i> FDAARGOS 289	GCF_002208825.2
<i>Brevundimonas viscosa</i> CGMCC 1.10683	GCF_900116065.1

### 3.12 COMPARAÇÃO GENÔMICA DE *CORE* E *ACCESSORY*

Os genomas completos e de referências do gênero *Brevundimonas* (**Tabela 5**) foram analisados contra o nosso isolado *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. por meio do programa Roary (PAGE et al., 2015). A árvore de *core* e *accessory* genoma foi feita a partir da pipeline do programa Roary (PAGE et al., 2015). Essa etapa foi realizada com o auxílio da Dra. Emeline Boni Campanini.

**Tabela 5.** Genomas de *Brevundimonas* utilizados na análise de *core* e *accessory* genoma.

Espécies	Número de acesso
<i>Brevundimonas abyssalis</i> TAR-001*	GCF_000466985.1
<i>Brevundimonas alba</i> DSM 4736*	GCF_011927945.1
<i>Brevundimonas aurantiaca</i> FXH-172*	GCF_020782355.1
<i>Brevundimonas albigilva</i> T7	GCF_023573565.1
<i>Brevundimonas aveniformis</i> DSM 17977*	GCF_000428765.1
<i>Brevundimonas bacteroides</i> DSM 4726*	GCF_000701445.1
<i>Brevundimonas basaltis</i> DSM 25335*	GCF_014202075.1
<i>Brevundimonas bullata</i> HAMBI_262*	GCF_003350205.1
<i>Brevundimonas diminuta</i> ATCC(B) 19146	GCF_004102925.1
<i>Brevundimonas diminuta</i> FDAARGOS_1026	GCF_016127655.1
<i>Brevundimonas diminuta</i> KX-1	GCF_022654015.1
<i>Brevundimonas diminuta</i> NCTC8545*	GCF_900445995.1
<i>Brevundimonas fluminis</i> LA-55*	GCF_003934285.1
<i>Brevundimonas goettingensis</i> LVF2*	GCF_017487405.1
<i>Brevundimonas halotolerans</i> MCS24*	GCF_003730275.1
<i>Brevundimonas huaxiensis</i> 090558*	GCF_014218725.1
<i>Brevundimonas intermedia</i> B-10	GCF_004614235.1
<i>Brevundimonas lenta</i> DSM 23960*	GCF_014196335.1



<i>Brevundimonas lutea</i> NS26*	GCF_003704105.1
<i>Brevundimonas mediterranea</i> D151-2-6	GCF_011064825.1
<i>Brevundimonas mediterranea</i> DSM 14878 *	GCF_014196125.1
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> B1	GCF_000635915.2
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> BRV3	GCF_003627995.1
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> DSM 23858*	GCF_000421705.1
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> FS1091	GCF_004421065.1
<i>Brevundimonas nasdae</i> A30	GCF_019395165.1
<i>Brevundimonas nasdae</i> Au29*	GCF_019395145.1
<i>Brevundimonas pishanensis</i> CHPC 1.3453*	GCF_022750635.1
<i>Brevundimonas pondensis</i> LVF1*	GCF_020524625.1
<i>Brevundimonas poindexteriae</i> EaN21-13*	GCF_017487345.1
<i>Brevundimonas</i> sp. AJA228-03	GCF_017795885.1
<i>Brevundimonas</i> sp. SSC2	GCA_013693835.1
<i>Brevundimonas</i> sp. Bb-A	GCF_009394735.1
<i>Brevundimonas</i> sp. CS1	GCF_017086445.1
<i>Brevundimonas</i> sp. DS20	GCF_001310255.1
<i>Brevundimonas</i> sp. GW460-12-10-14-LB2	GCF_001636925.1
<i>Brevundimonas</i> sp. LM2	GCF_002002865.1
<i>Brevundimonas</i> sp. M20	GCF_006547065.1
<i>Brevundimonas</i> sp. MF30-B	GCF_004683885.1
<i>Brevundimonas</i> sp. PAMC22021	GCF_019443405.1
<i>Brevundimonas</i> sp. 'scallop'	GCF_011045535.1
<i>Brevundimonas</i> sp. SGAir0440	GCF_005484585.1
<i>Brevundimonas subvibrioides</i> ATCC 15264*	GCF_000144605.1
<i>Brevundimonas terrae</i> DSM 17329*	GCF_011761985.1
<i>Brevundimonas vancouverii</i> NCTC9239	GCF_901421975.1
<i>Brevundimonas variabilis</i> DSM 4737*	GCF_014199945.1

<i>Brevundimonas vesicularis</i> FDAARGOS 289*	GCF_002208825.2
<i>Brevundimonas viscosa</i> CGMCC 1.10683*	GCF_900116065.1
<i>Brevundimonas vitisensis</i> GR-TSA-9*	GCF_016656965.1

---

\*Genomas referências de *Brevundimonas*

### 3.13 ANÁLISE DO GENOMA COM ORTHOVENN E KEEG

Para essas análises foram utilizadas as espécies mais próximas da cepa isolada de *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. de acordo com árvore do *core* genômico, sendo ela: *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858, *Brevundimonas naejangsanensis* B1 e *Brevundimonas naejangsanensis* FS1091. A análise de comparação do genoma interior da *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. contra os genomas das *Brevundimonas* escolhidos foi realizada por meio do servidor da web OrthoVenn2 (<https://orthovenn2.bioinfotoolkits.net>) (XU et al., 2019). A anotação de funções de alto nível e outros dados de alto rendimento sobre metabolismo foi feita pelo Banco de dados Genômico e Genes da Enciclopédia de Kyoto (KEGG) (KANEHISA & GOTO, 2000) utilizando a ferramenta Bacterial Pangenome Analysis Pipeline (BPGA) (CHAUDHARI et al., 2016) com as *Brevundimonas* selecionadas, assim foi possível a identificação detalhada dos genes *core*, dos genes acessórios e dos genes únicos.

### 3.14 CARACTERIZAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA

Genes de resistência a antibióticos foram pesquisados usando o servidor de *Rapid Annotation using Subsystem Technology*, RAST (AZIZ et al., 2008) (<https://rast.nmpdr.org/>) com parâmetros no default. Realizamos um Blast de nucleotídeos e aminoácidos com o banco de dados abrangente de resistência a antibióticos (CARD; <https://card.mcmaster.ca/>) (JIA et al., 2017), e com o banco do gene da resistência a antibióticos ANNOTation (banco de dados ARG-ANNOT) (GUPTA et al., 2014B). Para esses Blasts foi seguido um padrão de *evaluate* > 1e-5 e um *bitscore* > 100. No Blast de nucleotídeos do banco de dados do ARG-ANNOT e do CARD foram utilizados parâmetros de identidade e cobertura maior de 90%. Já no Blast de aminoácidos do CARD foi utilizado identidade maior de 70% e cobertura maior de 90%; no ARG-ANNOT a identidade foi maior de 30% e a cobertura maior de 90%.

Outras ferramentas on-line foram utilizadas para melhor anotação dos genes de resistência, sendo elas o CARDonline (<https://card.mcmaster.ca/>), o ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (BORTOLAIA et al., 2020) e o BacAnt (<http://bacant.net>) (HUA et al., 2021), utilizados com parâmetros default de cada ferramenta. O programa AMRFinderPlus 3.10 (FELDGARDEN et al., 2021) ferramenta desenvolvida pelo NCBI foi utilizado com pipeline de Blast, com *evaluate* > 1e-5 e *bitscore* > 100. A anotação dos fatores de resistência foi feita também pelo Banco de dados Genômico e Genes da Enciclopédia de Kyoto (KEGG) (KANEHISA & GOTO, 2000) utilizando a ferramenta online

BlastKOALA (<http://www.kegg.jp/blastkoala/>), para caracterização funcional dos genes de resistência.

Os genes de resistência a fluoroquinolonas foram identificados a partir da anotação do Prokka e alinhados manualmente (GILES et al., 2004) com as sequências *gyrA* de *E. coli* (AAG57360.1); *gyrA* *Salmonella enterica* (AAL21173.1); *gyrB* de *E. coli* (AAG58896.1) e *gyrB* de *Salmonella enterica* (AAL22694.1). Os genes que fornecem resistência a colistina foram identificados pela anotação do Prokka e as mutações foram identificadas manualmente.

Os fatores de virulência da cepa foram realizados através de Blast, com *evaluate* > 1e-5, utilizando o banco de dados *Virulence Factor Database* (CHEN et al., 2016). A *threshold* de identidade foi definida em 50% e foi utilizada uma cobertura maior de 80%.

### 3.15 IDENTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS MOVEIS (MGE)

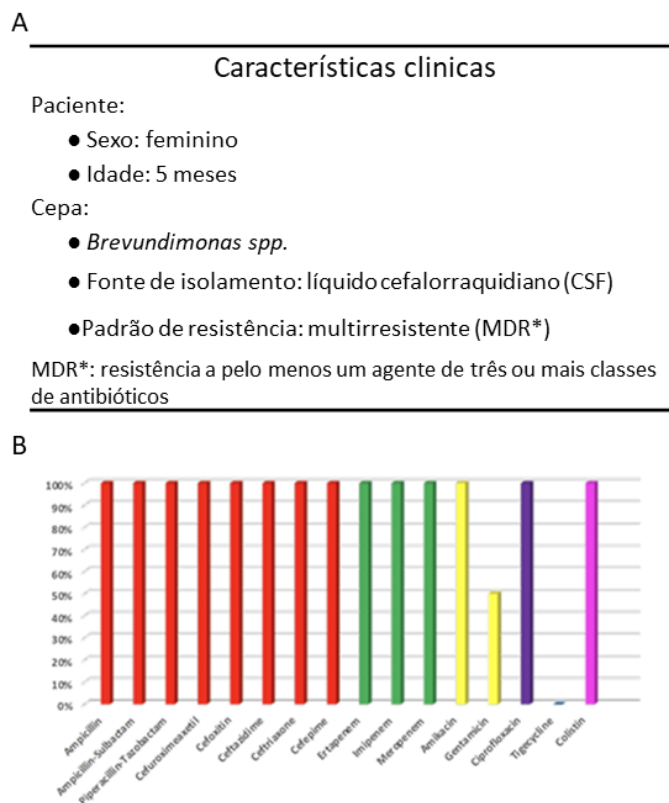
A investigação dos elementos moveis foi feita a partir de plataformas online. Para identificação de *integrans* e *transposons* foi utilizado o TnCentral (<https://tncentral.ncc.unesp.br/>) (ROSS et al., 2021). O servidor online do ISfinder foi utilizado para identificar sequências de inserção no nosso genoma (<https://isfinder.biotoul.fr/blast.php>) (SIGUIER et al., 2006). Para identificar elementos moveis e analisar sua relação com os fatores de virulência e resistência utilizamos o MGEfinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MobileElementFinder/>) da Technical University of Denmark (DTU). Os elementos integrativos e conjugativos (ICE) foram analisados e identificados pelo ICEfinder (BI et al., 2012) (<https://bioinformatics.sjtu.edu.cn/ICEfinder/ICEfinder.html>) A análise de fagos foi feita utilizando o PHAge Search Tool (PHAST) (<http://phast.wishartlab.com>) (ZHOU et al., 2011) e as repetições palindrômicas curtas foram estudadas pelo CRISPRfinder (<http://crispr.u-psud.fr/Server/CRISPRfinder.php>) (GRISSA et al., 2007).

## 4.RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PACIENTE E RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA DA BACTÉRIA

Uma cepa de *Brevundimonas* sp. foi isolada do Líquido Cefalorraquiano (LCR) de uma paciente do sexo feminino com 5 meses de idade, que se encontrava na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do Hospital Geral de Palmas (HGP), Tocantins (**Figura 10A**).

A amostra apresentou característica multidrogas resistentes (MDR) por apresentar resistência *in vitro* aos antibióticos Beta-lactâmicos (Ampicilina, Ampicilina-Sulbactam, Piperacillin-Tazobactam, Cefuroxima axetil, Cefoxitina, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefepima, Ertapenem, Imipenem, Meropenem), Polimixina E (Colistina), Quinolonas (Ciprofloxacina) e um tipo de Aminoglicosídeos (Amicacina). Apresentou também uma sensibilidade intermediária a um antibiótico da classe de Aminoglicosídeos (Gentamicina) e sensibilidade à Gliciclina (Tigeciclina) (**Figura 10B**).



**Figura 10.** Características clínicas e fenotípicas da *Brevundimonas* sp. (A) Dados do paciente e da cepa. (B) Caracterização fenotípica de padrões de resistência da cepa *Brevundimonas* sp.

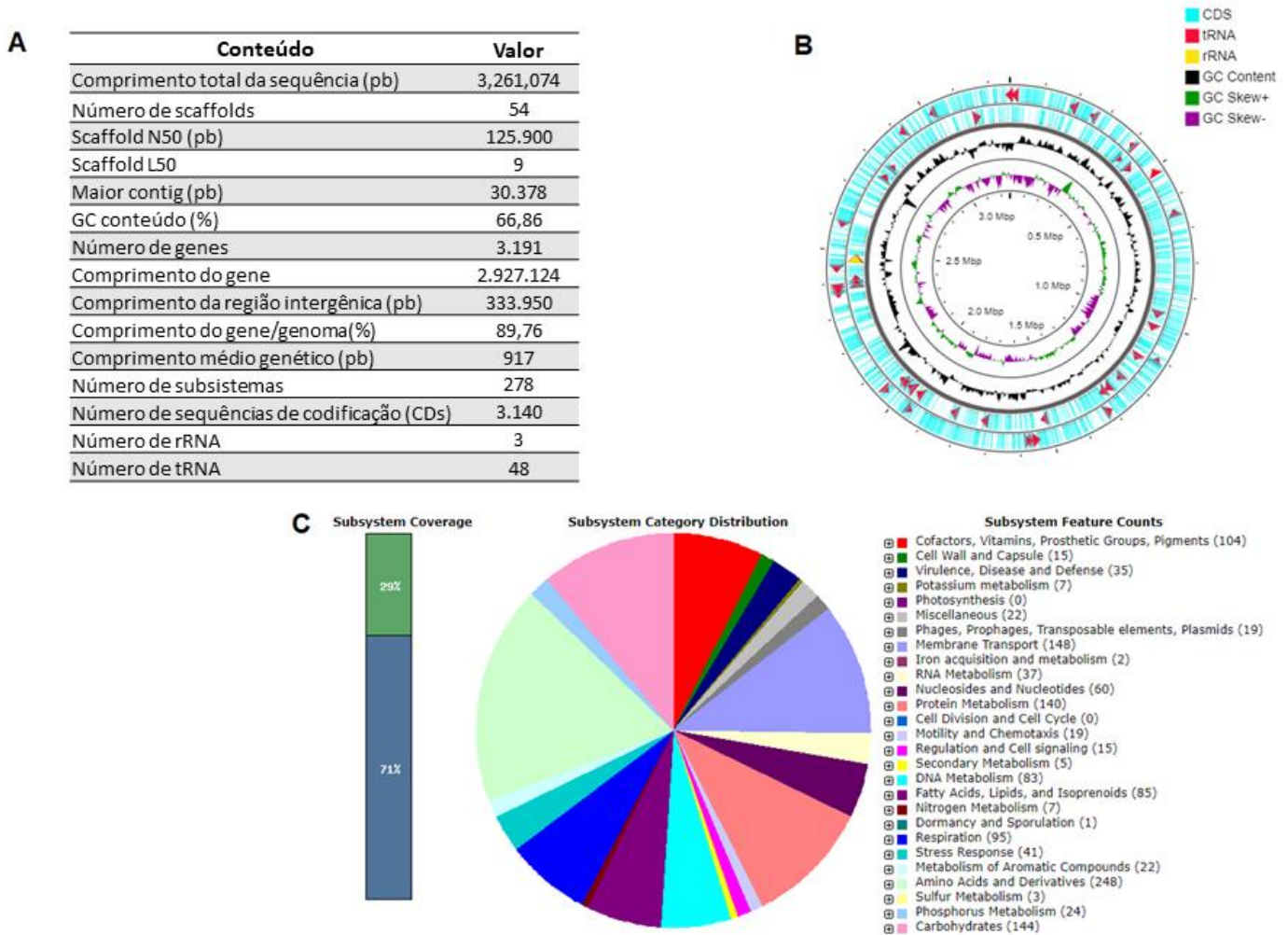
Classe de antibióticos: Beta-lactâmicos (barras vermelhas e verde (carbapenêmicos)), Aminoglicosídeos (barras amarelas), Quinolona (barra roxa), Glicilciclina (barra azul), Polimixina E (barra rosa).

## 4.2 SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA

O tamanho do genoma rascunho da *Brevundimonas* sp. foi de 3.261.074 bp, com 54 contigs, comprimento N50 de 125.900, e conteúdo G+C de 66,86%. O genoma consistiu em cerca de 3.140 seqüências codificadoras (CDSs) e 51 RNAs não codificadores (incluindo 48 tRNAs e 3 rRNAs) (**Figura 11A**). Nenhum plasmídeo foi encontrado na análise.

A **Figura 11B** representa o genoma em sua forma de cromossomo circular. Os círculos são enumerados de 1 (o mais externo) a 4 (o mais interno). Os círculos 1 e 2 contêm as sequências codificadoras de proteínas (CDS) e os RNAs encontrados na anotação. As CDS estão representadas na cor azul claro e os RNAs transportadores e ribossomal estão representados na cor vermelho e amarelo, respectivamente. O terceiro círculo na cor preta mostra o conteúdo G+C. O quarto círculo e mais interno representa o conteúdo G+C, podendo ser positivo (cor verde) ou negativo (cor violeta).

O genoma anotado pelo RAST está representado na **Figura 11C**, no qual está dividido em 278 subsistemas classificados em 27 categorias, a categoria com maior número de genes foram a de “aminoácidos e derivados” responsáveis por 248 genes, seguido pela categoria “transporte de membrana” com 148 genes e “carboidratos” (144 genes). Em seguida, temos “metabolismo proteico” (140 genes); “cofatores e derivados” (104 genes); “respiração” (95 genes); “ácidos graxos e derivados” (85 genes); “metabolismo de DNA” (83 genes); “nucleosídeos and nucleotídeos” (60 genes); “resposta ao stress” (41 genes); “metabolismo de RNA” (37 genes); “virulência, doenças e defesa” (35 genes). A categoria “virulência, doenças e defesa” é responsável por 21 genes relacionados a “resistência a antibióticos e compostos tóxicos” e 14 genes referentes a “invasão e resistência intracelular”. Na subcategoria “resistência a antibióticos e compostos tóxicos” foi identificado 2 genes responsáveis pela resistência a fluoroquinolonas, 1 gene para beta-lactamase, 1 gene de resistência multidroga relacionado à bomba de efluxo, 16 genes relacionados a homeostase de cobre e 1 gene relacionado a tolerância a cobre.



**Figura 11.** Dados de sequenciamento de todo o Genoma, mapa circular e distribuições de categorias de subsistemas. (A): Tabela com os dados estatísticos de montagem e anotação do genoma. (B): Representação circular do genoma. (C): Genoma anotado pelo *Rapid Annotation system Technology* (RAST). O verde no gráfico de barras corresponde à porcentagem de proteínas anotadas e o azul corresponde as proteínas não alocadas no subsistema. O gráfico em forma de “pizza” representa a distribuição percentual das categorias do subsistema. A direita do gráfico em forma de “pizza” está representada a contagem das características do subsistema.

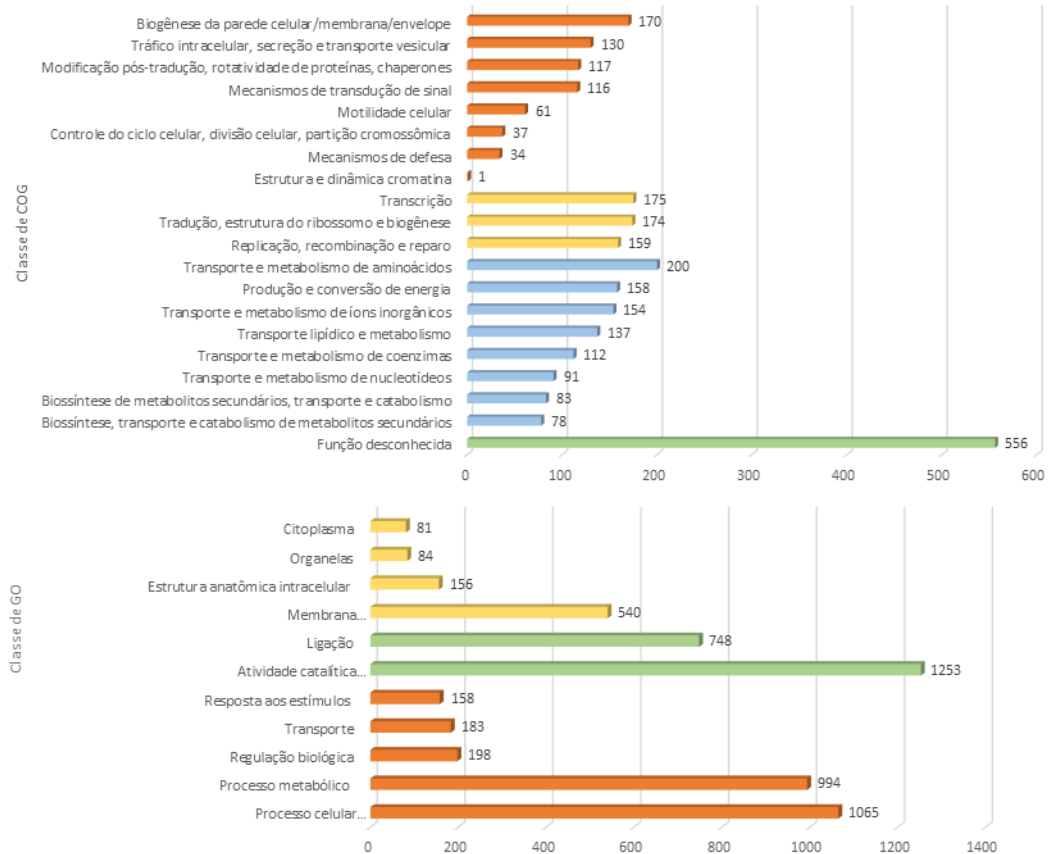
#### 4.3 GENES ORTOLOGOS COG E GO

Com o objetivo de realizar a anotação funcional do genoma da *Brevundimonas* sp. foram feitas análises com o banco de dados Clusters of Orthologous Genes (COG) (Figura 12A). A

ferramenta eggNOG possibilitou caracterizar um total de 2743 genes em 4 diferentes grupos funcionais COG: metabolismo (1013 genes; 36,93%), processos celulares e sinalização (666 genes; 24,28%), processamento e armazenamento de informação (508 genes; 18,51%), e a categoria de genes com função desconhecida (556 genes; 20,26%).

A categoria metabolismo é a mais abundante com genes distribuídos em oito subcategorias: metabolismo de aminoácidos (200 genes), produção e conservação de energia (158 genes), metabolismo de íons inorgânicos (154 genes), metabolismo de lipídeos (137 genes), metabolismo de coenzimas (112 genes), metabolismo de nucleotídeos (91 genes), biossíntese de metabolitos secundários, transporte e catabolismo (83 genes) e biossíntese, transporte e catabolismo de metabolitos secundários (78 genes). A categoria processos celulares e sinalização é responsável por genes subdivididos em biogênese da parede celular (170 genes), tráfico intracelular (130 genes), modificação postraducional (117 genes), mecanismo de transdução de sinais (116 genes), motilidade celular (61 genes), controle do ciclo celular (37 genes), mecanismo de defesa (34 genes) e estrutura e dinâmica da cromatina (1 gene). A categoria processamento e armazenamento de informação é subdividida em transcrição (175 genes); translação, estrutura ribossomal e biogêneses (174 genes); e replicação, recombinação e reparo (159 genes).

A Ontologia Genética (GO) da *Brevundimonas* sp. está representada na **figura 12B**. A análise ontológica mostrou um total de 2273 genes associados a termos GO, que representaram 71,38% da totalidade dos genes codificados. A distribuição GO mostrou que temos 1784 termos associados com “função molecular”, 1271 termos com “processo biológico” e 736 termos com “componentes celular”. A “função molecular” é subdividida em duas principais subcategorias “Atividade catalítica” (1253 termos GO) e “Ligação/Binding” (748 termos GO), equivalente a 70,24% e 41,93%, respectivamente. Em “processo biológico” a maioria dos genes foram caracterizados para as subcategorias como “processo celular” com 1065 termos GO (83,79%), seguida por “processos metabólicos” com 994 termos GO (78,21%), “regulação biológica” com 198 termos GO (15,58%), “transporte” com 183 termos GO (14,4%) e “resposta a estímulos” com 158 termos GO (12,43%). Na categoria “componentes celular” os termos GO mais atribuídos foram “membrana” (540 termos GO, 73,37%), “estrutura anatômica intracelular” (156 termos GO, 21,2%), “organelas” (84 termos GO, 11,41%) e “citoplasma” (81 termos GO, 11,01%).



**Figura 12.** Anotação funcional da amostra de *Brevundimonas* sp. (A) eggNOG com 4 categorias principais, sendo elas: metabolismo (barras em azul), processamento e armazenamento de informação (barras em amarelo), processos celulares e sinalização (barras em vermelho) e função desconhecida (barra em verde). (B) Distribuição da Ontologia genética da *Brevundimonas* sp. dividida em 3 categorias: função molecular (barras verdes), componentes celulares (barras amarelas) e processo biológico (barras laranjas). No eixo X temos a quantidade de termos GO por subcategoria (eixo Y).

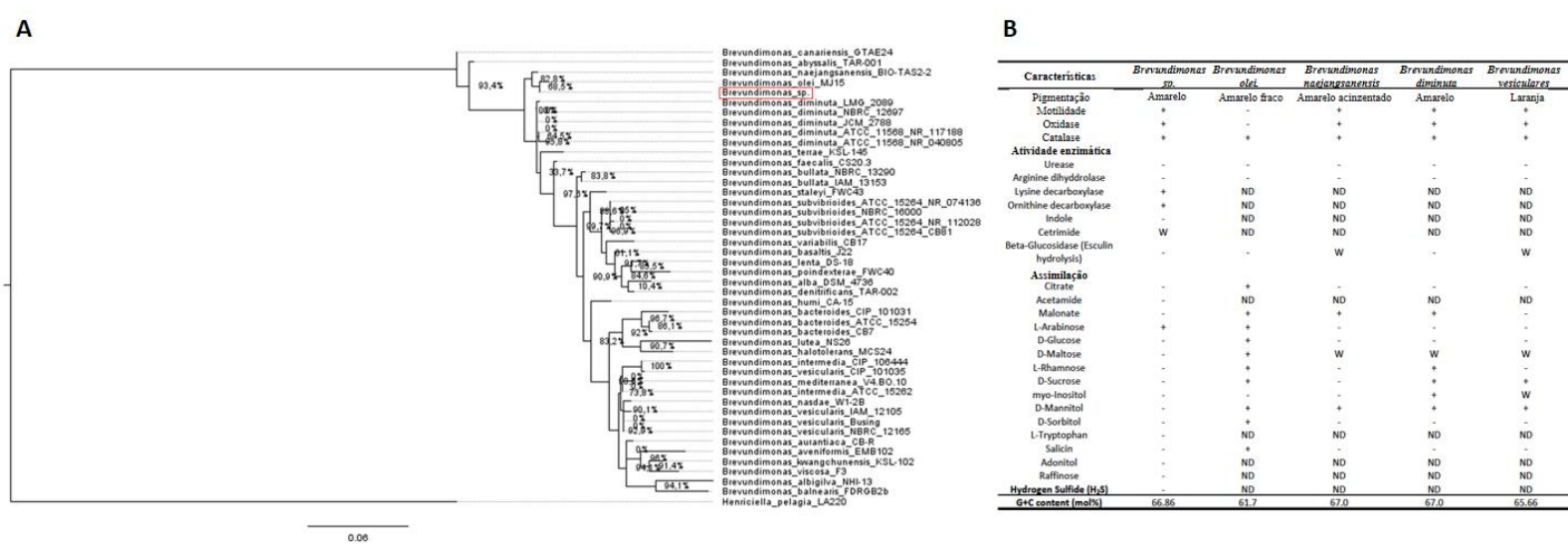
#### 4.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA DE 16S E TESTES BIOQUÍMICOS

A sequência genômica da *Brevundimonas* sp. apresentou apenas uma sequência genética de 16S rRNA, indicando que o conjunto genômico não foi contaminado por outros organismos. Portanto, uma árvore filogenética foi construída com base na sequência genética 16S rRNA (1459 bp) da cepa isolada e todas as sequências genéticas de 16S rRNA (n = 44) das espécies conhecidas de *Brevundimonas* depositadas no GenBank. A sequência de referência 16S rRNA da cepa LA220 de *Henriciella pelagia* foi utilizada como um *outgroup* (Tabela 1). Os resultados confirmaram que a *Brevundimonas* sp. representa um membro do gênero *Brevundimonas*. Nesta classificação taxonômica inicial, *Brevundimonas* sp. estava mais



relacionada com *Brevundimonas olei* com uma identidade de sequência de 99,71% (com 68,5% de suporte de bootstrap), seguida de *B. naejangsanensis* (BIO TAS2-2) com 99,37% de identidade (**Figura 13A**).

Para definir as características da *Brevundimonas* sp. foram efetuados testes bioquímicos e comparados com *Brevundimonas olei*, *Brevundimonas naejangsanensis*, *Brevundimonas diminuta*, e *Brevundimonas vesicularis* já descritas na literatura (**Figura 13B**). Ao contrário de *B. olei*, a cepa isolada era oxidase positiva e apresenta motilidade. Os resultados também mostraram que *Brevundimonas* sp. possui uma cor amarela, era catalase positiva, e assimilou apenas L-arabinose. A cepa isolada no trabalho é a única que não apresenta utilização de D-manitol quando comparada com outras espécies de *Brevundimonas* (**Figura 13B**).



**Figura 13.** Relação filogenética da *Brevundimonas* sp. e análise bioquímica comparativa. (A) Árvore filogenética baseada em 16S rRNA mostrando a relação entre a cepa de *Brevundimonas* sp e outras 32 sequências de genes de diferentes espécies de *Brevundimonas* da base de dados do NCBI. A descrição do nome em vermelho representa a cepa isolada nesse trabalho. (B) Características fenotípicas que diferenciam a cepa *Brevundimonas* sp. de algumas espécies *Brevundimonas* relacionadas. *Brevundimonas* sp. (dados deste estudo); *B. olei* MJ15T; *B. naejangsanensis* KCTC 22631T; *B. diminuta* KCTC 12488T; *B. vesicularis* KCTC 12421T (os dados foram retirados de LEE et al., 2010). Símbolos: +, positivo; -, negativo; W, reacção fraca; ND = nenhum dado disponível.

#### 4.5 ANÁLISE DE MLSA, ANI, DDDH E TYGS

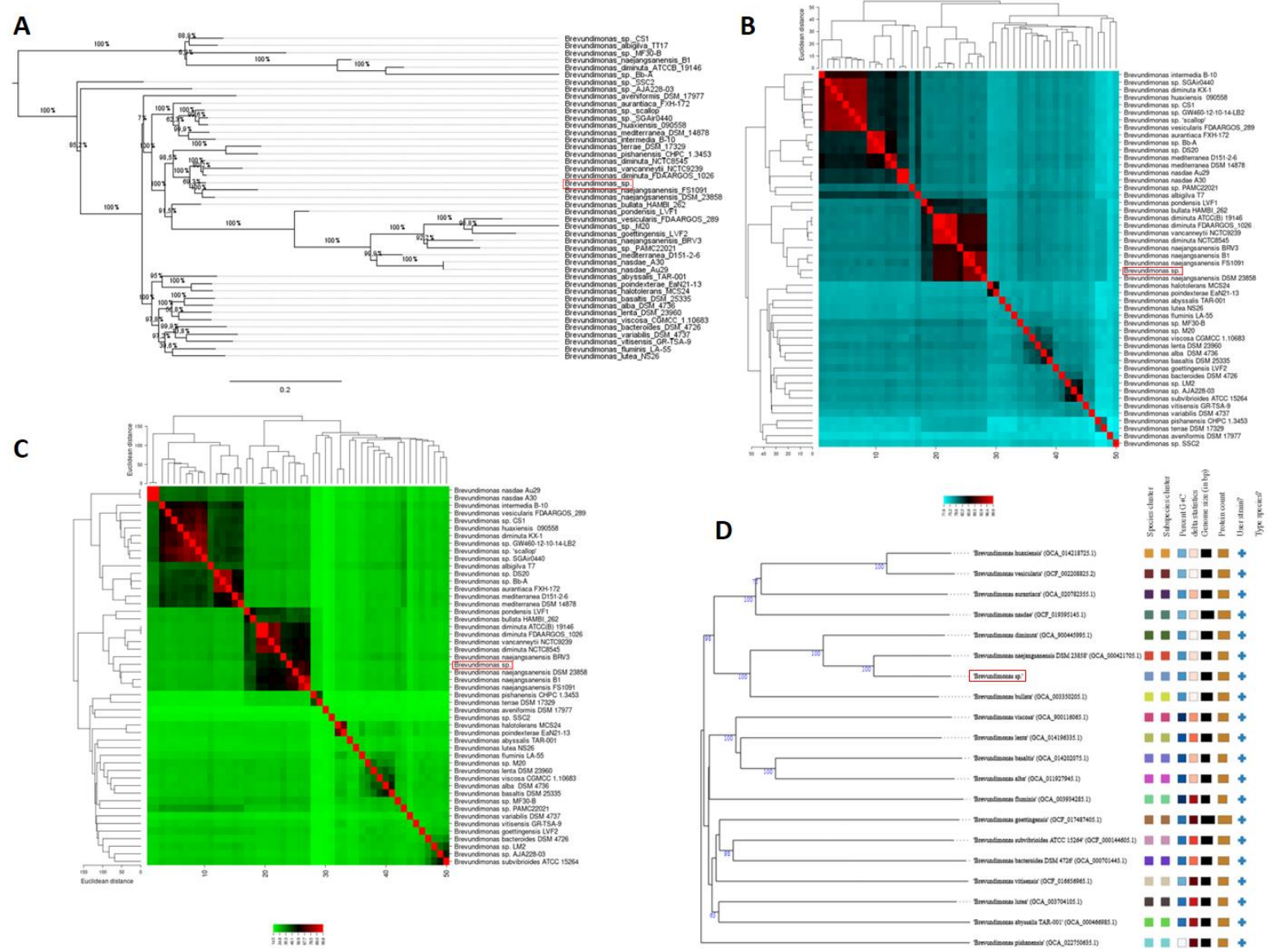
Foi realizada uma análise de sequências *multilocus* (MLSA) com 5 genes *housekeeping* recuperados de genomas do gênero *Brevundimonas*. A árvore filogenética (**Figura 14A**) foi gerada com base nas sequências concatenadas na seguinte ordem: *atpD* (1536 bp), *recA* (1080 bp), *ileS* (2922 bp), *rpoD* (1923 bp), e *trpB* (1224 bp), produzindo um alinhamento de 8684 pb.

A árvore MLSA mostrou a estreita associação entre o isolado *Brevundimonas* sp. e *Brevundimonas naejangsanensis* FS1091 (**Figura 14A**), seguida de *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858.

Embora, *Brevundimonas olei* apresentasse >99% de identidade de sequência de 16S rRNA com *Brevundimonas* sp., ela não tinha genes *housekeeping* ou sequência de genoma disponível no banco de dados de sequências genéticas para comparação. Portanto, *Brevundimonas olei* não foi incluída na análise de MLSA, ANI, dDDH e TYGS.

Adicionalmente, para determinar a distância genética entre o genoma da *Brevundimonas* sp. e os genomas analisados de *Brevundimonas* spp. foi realizado o cálculo GGDC de hibridização de DNA-DNA in silico, e foi calculado o valor orthoANI entre os genomas. Os valores encontrados de orthoANI são mostrados na forma de um *heatmap* na **Figura 14B**. Os valores calculados do GGDC (dDDH) estão representados como um *heatmap* na **Figura 14C**. Embora nessas duas análises (ANI e dDDH), a cepa de *Brevundimonas* isolada encontra-se mais próxima filogeneticamente da *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858 (ANI = 93,15%, dDDH = 63,0%), seguido de *Brevundimonas naejangsanensis* B1 (ANI = 92,60%, dDDH = 67,3%), *Brevundimonas naejangsanensis* FS1091 (ANI = 92,52%, dDDH = 62,9%), *Brevundimonas vancouverii* NCTC9239 (ANI = 89,31%, dDDH = 54,5%) (**Figura 14B e 14C; Tabela 6**), o isolado *Brevundimonas* sp. representa uma espécie nova, devido aos valores de ANI < 95%, e dDDH < 70%, o qual denominamos *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov.

Além disso, uma árvore filogenética baseada em genomas referências de *Brevundimonas* spp. e o isolado *Brevundimonas* sp. foi construída utilizando o TYGS, para confirmação da nova espécie. Embora, os resultados mostraram que *Brevundimonas* sp. estava mais estreitamente relacionadas com *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858 (**Figura 14D**), com valores de hibridação digital DNA-DNA (dDDH) (fórmula d4) de 50,8%, essa análise também posicionou *Brevundimonas* sp. como uma espécie nova.



**Figura 14.** Análise genômica comparativa de *Brevundimonas* spp. (A) Árvore filogenética do MLSA. (B) *Heatmap* com resultados referentes ao ANI. (C) *Heatmap* com cálculos referentes ao dDDH. (D) Árvore filogenômica baseada em resultados de TYGS mostrando a relação entre a cepa *Brevundimonas* sp com as cepas de sequências de referência *Brevundimonas* depositadas no NCBI. Árvore inferida com FastME 2.1.6.1 (LEFORT et al. 2015) a partir de GBDP (método de filogenia à distância do genoma BLAST) distâncias calculadas a partir de sequências genômicas. Os comprimentos dos ramos são escalados em termos da fórmula de distância GBDP d5. Os números acima dos ramos são valores de suporte de pseudo-bootstrap GBDP > 60 % de 100 replicações, com um suporte médio de ramo de 75,1 %. A árvore estava enraizada no ponto médio (FARRIS et al., 1972).

**Tabela 6.** Cepas e análise de ANI e dDDH contra a cepa isolada *Brevundimonas* sp.

Espécies	OrthoANI	DDH
<i>Brevundimonas abyssalis</i> TAR-001*	76.96	19.6
<i>Brevundimonas alba</i> DSM 4736*	77.51	22.4
<i>Brevundimonas aurantiaca</i> FXH-172*	78.10	24.3
<i>Brevundimonas albigilva</i> T7	78.94	26.8
<i>Brevundimonas aveniformis</i> DSM 17977*	73.81	15.2
<i>Brevundimonas bacteroides</i> DSM 4726*	76.83	20.9
<i>Brevundimonas basaltis</i> DSM 25335*	77.65	23.1
<i>Brevundimonas bullata</i> HAMBI_262*	82.75	41.3
<i>Brevundimonas diminuta</i> ATCC(B) 19146	88.89	52
<i>Brevundimonas diminuta</i> FDAARGOS_1026	88.89	52
<i>Brevundimonas diminuta</i> KX-1	78.54	25.2
<i>Brevundimonas diminuta</i> NCTC8545*	88.98	53.3
<i>Brevundimonas fluminis</i> LA-55*	76.49	21.4
<i>Brevundimonas goettingensis</i> LVF2*	77.31	21.3
<i>Brevundimonas halotolerans</i> MCS24*	75.98	19.5
<i>Brevundimonas huaxiensis</i> 090558*	78.51	25.0
<i>Brevundimonas intermedia</i> B-10	78.22	24.6
<i>Brevundimonas lenta</i> DSM 23960*	77.96	22.3
<i>Brevundimonas lutea</i> NS26*	76.36	19.1
<i>Brevundimonas mediterranea</i> D151-2-6	78.50	25.1
<i>Brevundimonas mediterranea</i> DSM 14878 *	78.21	24.6
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> B1	92.60	67.3
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> BRV3	87.48	50.7
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> DSM 23858*	93.15	63.0
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> FS1091	92.52	62.9
<i>Brevundimonas nasdae</i> A30	78.46	25.3
<i>Brevundimonas nasdae</i> Au29*	78.41	25.2
<i>Brevundimonas pishanensis</i> CHPC 1.3453*	76.52	21.3
<i>Brevundimonas pondensis</i> LVF1 *	83.08	39.7
<i>Brevundimonas poindexterae</i> EaN21-13*	76.34	19.9
<i>Brevundimonas</i> sp. AJA228-03	76.55	20
<i>Brevundimonas</i> sp. SSC2	74.91	16.5
<i>Brevundimonas</i> sp. Bb-A	78.22	23.8
<i>Brevundimonas</i> sp. CS1	78.11	24.1
<i>Brevundimonas</i> sp. DS20	78.13	24.3
<i>Brevundimonas</i> sp. GW460-12-10-14-LB2	78.48	24.8
<i>Brevundimonas</i> sp. LM2	77.15	20.7
<i>Brevundimonas</i> sp. M20	77.82	22.1
<i>Brevundimonas</i> sp. MF30-B	78.66	25
<i>Brevundimonas</i> sp. PAMC22021	78.02	23.4
<i>Brevundimonas</i> sp. 'scallop'	78.26	25.5
<i>Brevundimonas</i> sp. SGAir0440	78.08	25.6
<i>Brevundimonas subvibrioides</i> ATCC 15264*	77.03	20.7
<i>Brevundimonas terrae</i> DSM 17329*	76.31	21.2
<i>Brevundimonas vancouverii</i> NCTC9239	89.31	54.5
<i>Brevundimonas variabilis</i> DSM 4737*	75.69	17.8
<i>Brevundimonas vesicularis</i> FDAARGOS 289*	78.07	24.2
<i>Brevundimonas viscosa</i> CGMCC 1.10683*	77.87	23.0

<i>Brevundimonas vitisensis</i> GR-TSA-9*	76.47	20
---	-------	----

\*Genomas referências de *Brevundimonas*

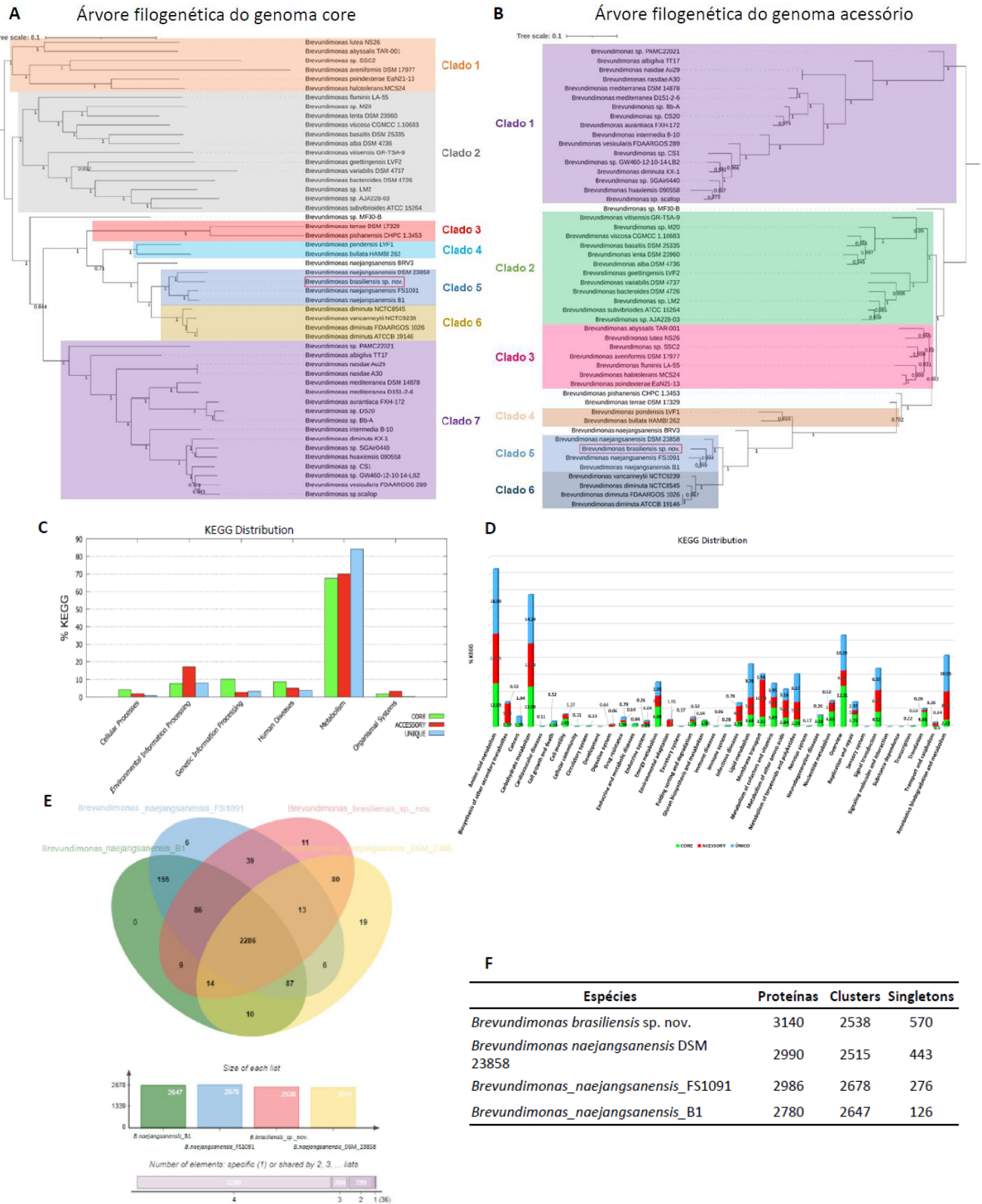
#### 4.6 ANÁLISE COMPARATIVA DE CORE GENÔMICO, ORTHOVENN E KEGG

A fim de investigar os padrões de evolução genética dos nossos genomas, construímos duas árvores filogenéticas baseadas nos genomas *core* e *accessory* da *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. e genomas completos e referências depositados no NCBI. As árvores foram divididas em sete clados principais de acordo com sua topologia e distância evolucionária. A posição relativa das espécies *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov., *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858 *Brevundimonas naejangsanensis* B1, *Brevundimonas naejangsanensis* FS1091 estão diferenciadas nas duas árvores. Na análise de genes *core*, a cepa *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. encontra-se mais próxima filogeneticamente da *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858 (**Figure 15A**). Entretanto, na análise de genes acessórios, o isolado *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. se posiciona em um novo ramo (**Figura 15B**).

Em seguida, analisamos a distribuição funcional dos genes presentes nas cepas do clado 5 (**Figura 15A e 15D**). A análise KEGG revelou que 77% (n=1794) dos genes estavam associados com o genoma *core*, 16,3% (n=379) ao genoma único, e 6,7% (n=157) ao genoma acessório. Os genes associados ao "metabolismo" representavam a maior proporção tanto no genoma único (84,16%; n=319), acessório (70,06%; n=110), quanto no *core* (67,61%, n=1213). As anotações desses genes únicos indicaram que a maioria estava relacionada ao "metabolismo de aminoácidos" (18,99%; n=72), "metabolismo de carboidratos" (14,24%; n=54) e biodegradação e metabolismo de xenobióticos (10,55%, n=40). Os genes do *core* estavam principalmente relacionados ao "metabolismo de aminoácidos" (12,93%; n=232), visão geral (12,21%; n=219), e "metabolismo de carboidratos" (11,98%; n=215). Os genes do acessório foram associados ao "metabolismo de aminoácidos" (14,65%, n=23) e ao "metabolismo de carboidratos" (12,74%, n=20). Os genes envolvidos em "doenças humanas" (n=176 ; 7,54%) representaram 6,6% (n=154) no *core*, 0,6% (n=14) no único, e 0,34% (n=8) no acessório. Interessante, no *cluster* de genes do *core* para doenças humanas foram encontrados genes relacionados à  $\beta$ -lactâmicos (5,68%; n=10), vancomicina (2,84%; n=5), e à resistência ao peptídeo catiônico antimicrobiano (CAMP) (5,68%; n=10).

A análise do cluster de genes ortólogos foi realizada entre as *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. e as *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858, *Brevundimonas naejangsanensis* FS1091, e *Brevundimonas naejangsanensis* B1. As quatro cepas compartilharam 1661 *clusters* de genes ortólogos. A *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. compartilhou 80, 39 e 9 *clusters* de genes ortólogos com a *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858, com a *B. naejangsanensis* FS1091, e com a *B. naejangsanensis* B1, respectivamente. O número de grupos de genes ortólogos únicos foi de 11 para *B. brasiliensis* sp., 19 para *B. naejangsanensis* DSM 23858, 6 para *B. naejangsanensis* FS1091, e nenhum para *B. naejangsanensis* B1. A **Figura 15E** mostra os *clusters* de genes ortólogos do diagrama Venn distribuídos entre as quatro cepas.

A cepa *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. continha o maior número de *singletons* (n = 570), seguido por *B. naejangsanensis* DSM 23858 (n = 443), *B. naejangsanensis* FS1091 (n = 276), e *B. naejangsanensis* B1 (n = 126) (**Figura 15F**). Os *singletons* da *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. apresentavam genes relacionados a resistência a antibióticos *strA*, *strB*, *aac6'Ib*, *drfA21*, *oprM*; e genes associados à virulência *virB11*, *cheB*, *mrsA/B*.



**Figura 15.** Análise genômica comparativa de cepas *Brevundimonas* spp e *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. (A) Árvore genômicas de genes essenciais. (B) Árvore genômicas de genes

acessórios. (C) Classificação da via KEGG em genomas essenciais, acessórios e únicos. (D) Distribuição da classificação da via KEGG. (E) Diagrama de Venn e gráfico de barras mostrando os números de genes ortólogos únicos e compartilhados nas quatro cepas *Brevundimonas* mais intimamente relacionadas. (F) Número de proteínas, *clusters* e *singletons*.

#### 4.7 RESISTOMA DA BACTÉRIA

Os genes de resistência aos antibióticos encontrados no genoma da *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. estão representados na **Tabela 7**. Conforme podemos observar foram encontrados 3 genes para beta-lactâmicos (*bla*BKC-1, *bla*TEM-16, *penP*), 4 genes para aminoglicosídeos (*strA*, *strB*, *aac*(6')-II e *aac*(6')-Ib'), 1 gene que codifica bomba de efluxo multi-droga que confere resistência às fluoroquinolonas (*Oqx*Bgb), 3 genes que codificam bombas de efluxo tripartidas baseadas em RND (*acrA* like, *acrB* like, *tolC* like) capazes de conferir resistência a um amplo espectro de antibióticos, incluindo  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina, novobiocina, e fluoroquinolonas, 2 genes associados com a resistência à tetraciclina e à eritromicina (*oprM* e *mexL*), 1 gene para tetraciclina (*tetA*), 1 gene glicopeptídico (*vanY*), 1 para trimetropina (*drfA21*), 1 para sulfadimina (*sulI*), 1 gene codificante de peptídeos catiônicos antimicrobianos como a daptomicina (*mprF*) e 1 gene de anfenicol (*floR*).

**Tabela 7:** Genes de resistência da cepa *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov.

Fenotipagem		Genotipagem/ Propriedade das Proteínas					
Classe de antibióticos	Resistência a antibióticos (Vitek-2)	Sequência referência (NCBI e KEEG)	Genes de resistência putativos	Gene de resistência/proteína, mecanismo de funcionamento	Tamanho (aa)	Identidade de aa (%)	Metodologia
Beta-lactâmicos	Ampicilina, Ampicilina-Sulbactam, Piperacillin-Tazobactam, Cefuroxima axetil, Cefoxitina, Ceftriaxona, Cefepima, Ertapenem, Imipenem, Meropenem	K17836	<i>penP</i>	Beta-lactamase classe A	299	60.00	KEGG
		U36911	<i>bla</i> TEM-116	Classe A amplo espectro Beta-lactamase TEM-116	286	100.00	AMRFinderPlus RESfinder ARG-ANNOT CARDonline CARDblast AMRFinder Bacant
		KP689347	<i>bla</i> BKC-1	Familia BKC carbapenem-hidrolize, classe A beta-lactamase	605	100.00	RESfinder ARG-ANNOT CARDblast AMRFinder Bacant
Aminoglicosídeos	Amikacin, Gentamicina	AB366441	<i>strA</i>	Streptomicina 3"-quinase	139	100.00	ARG-ANNOT KEGG
		FJ474091	<i>strB</i>	Streptomicina 6"-quinase	279	100.00	ARG-ANNOT KEGG
		AJ584652	<i>aac</i> (6')-Ib'	Aminoglicosídeo N-acetiltransferase AAC(6')-Ib'	210	100.00	CARDblast AMRFinder Bacant
		U13880	<i>aac</i> (6')-II	Aminoglicosídeo N-acetiltransferase AAC(6')-II	459	100.00	RESfinder CARDonline
Quinolonas	Ciprofloxacina	ADL01935	<i>gyrA</i> *	DNA gyrase subunit A	924	86.00	Prokka RAST KEEG



			ADK99321	<i>gyrB</i> <sup>*</sup>	DNA gyrase subunit B	809	84.00	Prokka RAST KEEG
			EU370913	<i>OqxBgb</i>	OqxB integral membrane protein	396	48.20	ARG-ANNOT
Polimixina	Colistina		ALJ07207	<i>qseC</i> <sup>c</sup>	Sistema de dois componentes, família OmpR, sensor histidina quinase QseC	439	61.00	Prokka KEEG
			-	<i>phoP</i> <sup>p</sup>	DNA-binding regulador duplo transcricional PhoP	226	-	Prokka
			ADL00797	<i>acrA</i> like	Bomba de efluxo multi-drogas lipoproteína de fusão por membrana AcrA	381	66.00	KEEG
Bomba de efluxo			ADL00798	<i>acrB</i> like	BOMBA DE EFLUXO MULTI-DROGAS RND PERMEASE ACRB	1079	83.00	KEEG
			ADL01129	<i>tolC</i> like	Canal externo de membrana TolC	524	65.00	KEEG
			AKH42737	<i>oprM</i>	Proteína de membrana externa OprM	495	99.00	KEEG
			ADK99730	<i>mexL</i>	Proteína reguladora TetR	199	63.00	KEEG
Tetraciclina		(-)	AAN06707.1	<i>tetA</i>	Proteína de resistência à tetraciclina, classe A TetA(A)	425	77.00	KEGG
Glicopeptídeo		(-)	ADL01677	<i>vanY</i>	VanY-A/VanY-F/VanY-M família D-Ala-D-Ala carboxipeptidase	285	66	KEEG
Sulfonamida		(-)	JF969163	<i>sulI</i>	Di-hidropteroate sintetase resistente a sulfonamidas SulI	279	100.00	RESfinder ARG-ANNOT CARDonline CARDblast AMRfinder Bacant
Resistência ao peptídeo catiônico antimicrobiano (CAMP)		(-)	Q8FW76	<i>mprF</i>	Lisilfosfatidilglicerol bifuncional flipase/sintetase MprF	554	73	KEEG
Fenicol		(-)	AKLJ01000508	<i>flor</i>	Transportador MFS de cloranfenicol/florfenicol, FloR;	286	95,122	RESfinder ARG-ANNOT CARDblast AMRfinder Bacant
Diamino-pirimidina Trimetoprima		(-)	AY552589	<i>dfrA21</i>	Dihidrofolato redutase resistente a trimetoprima tipo A21	165	100.00	RESfinder ARG-ANNOT CARDonline CARDblast AMRfinder Bacant

(-) Testes de susceptibilidade não realizados. Mutações em genes que conferem resistência a \*quinolonas (GyrA, S83L e D87H; GyrB, Leu-466) e o colistina (PhoP, Arg81Cis e qseC, Ile283Leu). Bombas de efluxo mexJK forenecem resistência a triclosan em *P. aeruginosa* (CHUANCHUEN et al.,2002); MexAB-OprM fornece resistência a uma grande quantidade de antibióticos (quinolonas,  $\beta$ -lactams, tetraciclina, cloranfenicol e macrolídeos) (WANG et al., 2010); a bomba de efluxo acrAB-tolC fornece resistência a cloranfenicol, fluoroquinolona, tetraciclina, novobiocina, ácido fusídico, ácido nalidíxico e antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em *Escherichia coli* (CHOWDHURY et al., 2019).

Foram identificados genes que quando mutados podem conferir resistência à fluorquinolona (*gyrA* e *gyrB*) e à colistina (*phoP* e *qseC*) (**Figura 16**). Em nossas análises, para a resistência à fluorquinolonas, foram identificadas duas mutações de substituição uma no *gyrA*, de Serina para Leucina no sitio 83 e uma no Aspartato para Histidina no sítio 87. No gene *gyrB* foi encontrado uma substituição de Glutamina sítio 466 para Leucina. Mutações que podem conferir resistência à colistina foram identificadas na sequência das proteínas *qseC* aminoácidos (sítio 8 e 283), *phoP* (sítio 81).

A		B				
<b>GyrA</b>		<b>Gene</b>	<b>Sítio</b>	<b>Mutação</b>	<b>Bactéria</b>	<b>Referência</b>
<i>Escherichia coli.</i>	79 PHGDSAVYDTIVR 91	<i>gyrA</i>	83	Ser ou Tre – Leu	<i>Enterobacteriaceae</i>	Minarini & Darini, 2012
<i>Salmonella enterica</i>	79 PHGDSAVYDTIVR 91					Weigel et al., 1998
<i>Brevundimonas brasiliensis</i> sp. nov	79 VGDV LGRF LPHGD91	<i>gyrA</i>	87	Asp ou Ghu – His	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Brevundimonas</i> sp.	Minarini & Darini, 2012
						Weigel et al., 1998
<b>GyrB</b>		<i>gyrB</i>	466	Glu – Leu	<i>Brevundimonas diminuta</i>	Han & Andrade., 2005
<i>Escherichia coli.</i>	461 MLSSQEVATL 470	<i>gyrB</i>	466	Glu – Leu	<i>Brevundimonas diminuta</i>	
<i>Salmonella enterica</i>	461 MLSSQEVATL 470					
<i>Brevundimonas brasiliensis</i> sp. nov	461 LRGK L NVER 470					Pitt et al., 2019
<b>QseC</b>		<i>qseC</i>	8	Ser – Arg	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Berghund., 2019
<i>Brevundimonas brasiliensis</i> sp. nov	4 IRIR L FA 10 - 281 LL A LA 285					
<b>PhoP</b>		<i>phoP</i>	81	Arg – Cis	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pitt et al., 2019
<i>Brevundimonas brasiliensis</i> sp. nov	80 AR GAWS 85					Berghund., 2019

**Figura 16.** Mutações que conferem resistência a Fluorquinolonas e Colistina (MINARINI & DARINI, 2012; WEIGEL et al., 1998; HAN & ANDRADE, 2005; PITT et al., 2019; BERGLUND, 2019).

## 4.8 FATORES DE VIRULÊNCIA

A *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. apresentou 18 genes que codificam fatores associados à virulência, incluindo formação de biofilme (*carB*, *ricA*, *msrAB*, *clpP*), adesão (*cheB*, *bpsC*), invasão (*FliP*, *FliI*, *virB11*), síntese LPS/O-antigénio (*gmd*), síntese de sideróforo (*dhbA*, *dhbE*), isocitrato lisase (*icl*), fator de alongamento Tu (*tufA*), 2-de-hidro-3-deoxifosfoctonato aldolase (*kdsA*), proteína de choque térmico (*htpB*) e secreção (*gspG*, *xcpR*). A análise dos fatores de virulência está demonstrada na **Tabela 8**.

**Tabela 8:** Genes de virulência da cepa *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov.

Gene ID	Gene putativo	Descrição	Tamanho (aa)	Espécies	Identidade aa (%)
YP_170571	<i>carB</i>	Subunidade grande de fosfato carbamoyl sintase	1099	<i>Francisella tularensis</i> subsp. tularensis SCHU S4	58.99
NP_539653	<i>ricA</i>	Rab2 interagindo a proteína conservada A	176	<i>Brucella melitensis</i> bv. 1 str. 16M	54.91
NP_273110	<i>msrA/B</i> ( <i>piI/B</i> )	Trifuncional proteína tioredoxina/methionine sulfoxide redutase A/B	147	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	60.99
NP_465991	<i>clpP</i>	Subunidade protease Clp dependente de ATP	213	<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e	53.19
YP_001006775	<i>cheB</i>	Quimiotaxia específica da metilesterase CheB	345	<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. enterocolitica 8081	50.86
AJI07989.1	<i>bpsC</i>	UTP--glicose-1-fosfato uridiltransferase	297	<i>Bacillus cereus</i> G9241	51.58
YP_989394	<i>FliP</i>	Proteína biossintética flagelar FliP	263	<i>Bartonella bacilliformis</i> KC583	50.41
YP_855907	<i>fliI</i>	Sintetizador ATP específico para Flagellum	466	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. hydrophila ATCC 7966	50.12
YP_034060	<i>virB11</i>	Sistema de secreção tipo IV homólogo da proteína virB11	355	<i>Bartonella henselae</i> str. Houston-1	51.81
YP_034060	<i>virB11</i>	Sistema de secreção tipo IV homólogo da proteína virB11	336	<i>Bartonella henselae</i> str. Houston-1	54.08
YP_001007257	<i>gmd</i>	GDP-manose 4,6-dehidratase	325	<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. enterocolitica 8081	51.57
NP_832065	<i>dhbA</i>	2,3-dihidroxi benzoato-2,3-dehidrogenase, DhbA	256	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	52.76
NP_832067	<i>dhbE</i>	2,3-dihidroxi benzoato de adenilase DhbE	256	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	63.99

YP_177728	<i>Icl</i>	Isocitrato liase Icl	425	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	54.08
YP_169203.1	<i>(tufA)</i>	Fator de alongamento Tu	396	<i>Francisella tularensis</i> subsp. tularensis SCHU S4	78.28
NP_539767	<i>kdsA</i>	2-de-hidro-3-deoxifosfooctonato aldolase	300	<i>Brucella melitensis</i> bv. 1 str. 16M	66.79
YP_094724	<i>htpB</i>	Hsp60, 60K proteína de choque térmico HtpB	548	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. pneumophila str. Philadelphia 1	65.97
YP_404603	<i>gspG</i>	Proteína G da via de secreção geral	172	<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197	54.75
NP_251793	<i>xcpR</i>	Proteína E da via de secreção geral	497	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	54.36

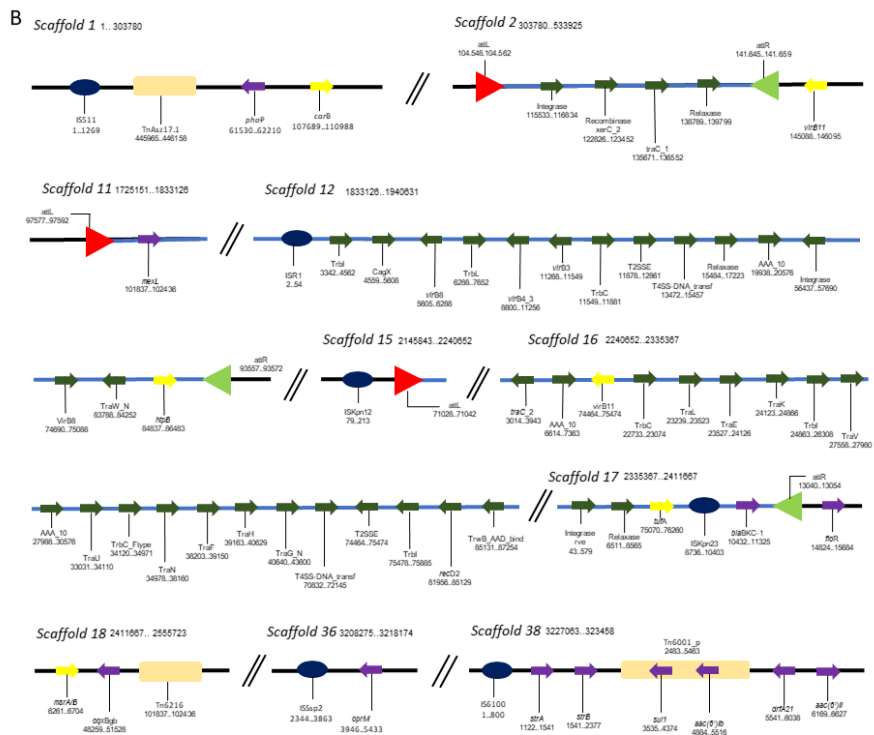
#### 4.9 ELEMENTOS MOVEIS DA BACTÉRIA

Nossas análises identificaram um número considerável de elementos móveis dentro do nosso genoma de *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. (**Figura 17A e 17B**). Dentre eles, nós encontramos *transposons* advindos da família Tn3 tais como, TnAsz17.1; Tn5393; Tn6216; Tn6001\_p e Tn801. Sequências de inserção da família IS3 como IS511, ISR1 e ISSp2 apareceram mais de uma vez no genoma. A família IS6 apresentou 3 sequências de inserção IS6100 e a família IS5 apresentou duas sequencias de inserção ISKpn12. No *scaffold* 1 temos a presença do *transposon* TnAsz17.1, a sequência de inserção IS511, e o gene que confere resistência *phoP* quando mutado, e do gene de virulência *carB*. A IS6100 está acompanhada dos genes de resistência *tolC* e *vanY* no *scaffold* 7 e a ISR1 está acompanhada do gene de virulência *htpB* no *scaffold* 12. No *scaffold* 17 temos a presença da ISKpn12 com 2 genes de resistência (*blaBKC-1*, *floR*) e um gene de virulência (*tufA*). O *scaffold* 18 tem o transposon Tn6216 e os genes de resistência *oqxBgb* e virulência *msrA/B*. A ISSp2 está acompanhada do gene de resistência *oprM* no *scaffold* 36. No *scaffold* 38 temos o Tn6001\_p, a IS6100 e 6 genes de resistência (*strA*, *strB*, *sul1*, *drfA21*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-II*) (**Figura 17A**).

O ICE denominado IME é delimitado pelas sequencias *attL* (ggcggatgacggccc) e *attR* (ggcggatgacggccc) e apresenta o gene de virulência *virB11* no *scaffold* 2 (**Figura 17B**). O primeiro ICE T4SS é delimitado por sequencias *attL* (ggcggcggcggcggcg) e *attR* (ggcggcggcggcggcg), esse ICE está dividido entre os *scaffolds* 11 e 12 e nesses *scaffolds* temos a presença de um gene resistência *mexL* e um gene de de virulência *htpB*, respectivamente (**Figura 17B**). O segundo ICE com T4SS está delimitado por *attL* (tgctggatcgccg) e *attR* (tgctggatcgccg) nos *scaffolds* 15 ao 17 e apresenta 2 genes de resistência (*blaBKC-1* e *floR*) e dois genes de virulência (*virB11* e *tufA*) nesses mesmo *scaffolds* (**Figura 17B**). Os elementos CRISPR e fago não foram detectados no genoma de *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov.

**A**

Tipo de MGE	Familia	Scaffold	ID	Número de acesso	Posição no Scaffold	Programa	Genes de Virulência e Resistência	Posição	
Transposon	Tn3	1	TnAsz17.1	AP010946	445965..446158	Tncentral	phoP carB	61530..62210 107689..110988	
		6	TnS393	M96392	-	ISFinder	-	-	
		18	Tn6216	KC511628	64756..68583	Mobile Element Finder	oxyBgb mraA/B	48259..51528 6261..5704	
		38	Tn6001_p	EF138817	2483..5463	Tncentral	strA strB sul1 gfpA21 aac(6)-Ib aac(6)-II	1122..1541 1541..2377 3535..4374 5541..6038 4884..5516 6169..6627	
		41	Tn801	AF080442	-	ISFinder	-	-	
Sequência de inserção (IS)	IS3	1	ISS11	U39501	1..1269	ISFinder	phoP carB	61530..62210 107689..110988	
		5	ISR1	X06616	-	ISFinder	-	-	
		12	ISR1	X06616	2..54	ISFinder	htpB	84837..86483	
		22	ISR1	EU780013	-	ISFinder	-	-	
		29	ISS11	U39501	-	ISFinder	-	-	
	IS6	7	IS6100	X53635	127753..127807	ISFinder	tolC vanY	82081..89655 108233..109090	
		19	IS6100	X53635	-	ISFinder	-	-	
		38	IS6100	X53635	1..800	Mobile Element Finder	strA strB sul1 gfpA21 aac(6)-Ib aac(6)-II	1122..1541 1541..2377 3535..4374 5541..6038 4884..5516 6169..6627	
		9	ISKpn12	EU780013	-	ISFinder	-	-	
		15	ISKpn12	EU780013	-	ISFinder	-	-	
	ICE	T4SS	2	Putativo ICE com T4SS	-	attL-104.548..104.582 attR-141.645..141.659	ICEFinder	virB11	145088..146095
			11-12	Putativo ICE com T4SS	-	attL-97577..97592 attR-83557..83572	ICEFinder	htpB mexL	84837..86483 101837..102436
			15-16-17	Putativo ICE com T4SS	-	attL-71028..71042 attR-13040..13054	ICEFinder	bioBKC-1 flaR tufA virB11	10432..11325 14824..15684 75070..76260 74464..75474
			17	ISKpn23	KF689347	8736..10403	ISFinder	-	-



**Figura 17.** Elementos moveis identificados na *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. (A) Tabela com MGEs encontrados na *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. (B) Representação gráfica dos scaffolds 1,2,11,12,15,16,17,18,36 e 38 com os MGEs e genes de resistência e virulência. Linha

preta representa a fita de DNA do *scaffold*, a linha azul representa as ICEs. Os triângulos vermelhos e verdes claro são os *attLs* e *attRs* respectivamente. Os retângulos laranja claro são os *transposons* e os círculos azul escuro são as sequências de inserção. Os genes são representados pelas flechas, as flechas verdes escuras são os genes referentes a conjugação dos ICEs, as flechas amarelas são os genes de virulência e as flechas roxas são os genes de resistência.

## 5. DISCUSSÃO

Algumas espécies do gênero *Brevundimonas* sp. tem sido consideradas patógenos oportunistas raros, e a maioria das infecções ocorrem em pacientes imunocomprometidos (RYAN & PEMBROKE, 2018; CHANDRA et al., 2017; SINGH & BHATIA, 2015). Em nosso estudo, a cepa de *Brevundimonas* foi isolada do líquido cefalorraquidiano de um bebê com 5 meses de idade e do sexo feminino. Embora estudos sugerem que as infecções por *Brevundimonas* sp. em crianças não são frequentes (LIU et al., 2021; SINGH & BHATIA, 2015), acreditamos que este cenário pode estar mudando, pois novos testes moleculares e fenotípicos, em comparação com os métodos convencionais, estão fornecendo uma identificação rápida e precisa de muitas bactérias, incluindo bacilos gram-negativos não fermentadores de glicose (GIACOBBE et al., 2020; CIMMINO & ROLAIN, 2016; WANG et al., 2016), como *Brevundimonas* sp.

A análise fenotípica realizada pelo sistema de automação-VITEK-2, embora tenha identificado o gênero da cepa isolada, não conseguiu caracterizar a espécie. No entanto, quando analisamos o perfil de resistência aos antibióticos mais comumente utilizados para tratar infecções ocasionadas por bactérias gram-negativas, a cepa *Brevundimonas* sp. apresentou um perfil de resistência à múltiplas drogas, sendo resistente aos beta-lactâmicos, polimixina E (colistina), aminoglicosídeos e fluorquinolonas. Adicionalmente, observamos susceptibilidade somente à tigeciclina. No gênero *Brevundimonas*, os mecanismos de resistência permanecem mal compreendidos (RYAN & PEMBROKE, 2018), no entanto, sabe-se que o perfil de resistência pode ser muito variado. As *Brevundimonas vesicularis* e *Brevundimonas diminuta* são as principais espécies isoladas das infecções humanas (LUPANDE-MWENEBITU et al., 2021) e estudos relataram que ambas as espécies podem ser resistentes (ALMUZARA et al. 2012; HAN & ANDRADE, 2005; GUPTA et al., 2014A) ou susceptíveis (CHI et al., 2004; LUPANDE-MWENEBITU et al., 2021; CHANDRA et al., 2017) à maioria dos antibióticos testados neste estudo. Nossos dados reforçam a necessidade de estudos mais aprofundados sobre o perfil e mecanismos de resistência aos antibióticos no gênero *Brevundimonas*.

Considerando que o sequenciamento do genoma completo bacteriano (WGS) está se tornando uma técnica revolucionária na caracterização de alta resolução de patógenos bacterianos em termos de resistência a antibióticos, epidemiologia molecular e virulência, decidimos explorar as características genômicas da cepa *Brevundimonas* sp., através dessa técnica. Os resultados do nosso *draft genome* mostrou que a cepa apresenta um genoma total de 3.262.074 pb (2.54 Mb - 3.98 Mb) com um conteúdo de G+C de 66,86% (60,8 mol% - 70,4 mol%), o que está de acordo com a maioria das sequências depositadas no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>).

Como já mencionado, a análise feita pelo sistema de automação-VITEK-2 não conseguiu distinguir entre a espécie do isolado *Brevundimonas*, deste modo, tentamos identificar a espécie através de análise de filogenia e de ferramentas de análise do genoma completo como o ANI, hibridização digital DNA-DNA, DDH e TYGS. A análise filogenética preliminar baseada em sequências de genes 16 rRNA confirmou que a cepa pertence ao gênero *Brevundimonas*, e compartilhou a maior semelhança com *Brevundimonas olei* MJ15 (99,71%), seguida da *Brevundimonas naejangsanensis* BIO TAS2-2 (99,37%). Embora o gene 16S rRNA seja amplamente utilizado para diferenciar cepas a nível do gênero (HAYASHI SANT'ANNA et

al., 2019), esta ferramenta possui um fraco poder discriminatório a nível das espécies, pois os genes 16S rRNA são idênticos ou altamente homólogos entre algumas espécies diferentes (JANDA & ABBOTT, 2007). A fim de ajudar na identificação bacteriana, foram realizados testes bioquímicos, e ao contrário da *Brevundimonas olei*, as análises revelaram que a cepa isolada é um bacilo oxidase positivo e apresenta motilidade. A análise de sequência *multilocus* (MLSA) baseada em vários genes *housekeeping* tornou-se uma técnica de alta resolução empregada para elucidar a relação taxonômica e a análise filogenética de cepas, subespécies e componentes estreitamente relacionados (DAI et al., 2020; LIU et al., 2017). O MLSA baseado em cinco genes *housekeeping* (*atpD*, *recA*, *ileS*, *rpoD* e *trpB*) mostrou que o isolado *Brevundimonas* sp. foi claramente separado das *Brevundimonas naejangsanensis* FS1091 e *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858, indicando uma nova espécie dentro do gênero *Brevundimonas*. O ANI e/ou dDDH tem sido utilizado como “padrão ouro” para a delimitação de espécies (HU et al., 2022). Além disso, estudos têm relatado que o dDDH é considerado necessário quando as cepas partilham mais de >98,7% de similaridade entre as sequências de 16S rRNA (TINDALL et al., 2010; GILLIS et al., 2005), como observado com a *Brevundimonas* sp., *Brevundimonas olei* e *Brevundimonas naejangsanensis* BIO TAS2-2. Para obter resultados mais precisos sobre a identificação da espécie, foram realizadas análises de identidade nucleotídica média (ANI) e digital DDH (dDDH) entre a cepa *Brevundimonas* sp. e sequências genômicas de referência e completas dentro do gênero *Brevundimonas*. Os nossos dados revelaram que os valores para ANI (<95%) e dDDH (<70 %) eram inferiores ao nível de espécie geralmente aceito, mostrando que o isolado *Brevundimonas* sp. representa uma espécie nova. Para validar ainda mais os resultados, foi construída uma árvore filogenética inferida através da distância do genoma BLAST (GBDP) com o TYGS, utilizando a cepa de *Brevundimonas* sp. e as sequências de referências depositadas no GenBank. As análises do TYGS também mostraram que a cepa *Brevundimonas* sp. é uma espécie nova. Com base nestas descobertas, o nome *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. foi proposto.

Posteriormente, nós analisamos a similaridade e distância dentro do gênero *Brevundimonas* construindo duas árvores filogenéticas com base nos genomas *core* e *accessory* (Huang et al., 2022). As árvores apresentavam uma topologia diferente. No entanto, nas duas árvores, a *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov., a *B. naejangsanensis* DSM 23858, a *B. naejangsanensis* FS1091, e a *B. naejangsanensis* B1 foram agrupadas no mesmo clado (clado 5). A *B. brasiliensis* sp. nov. mostrou uma relação evolutiva com a *B. naejangsanensis* DSM 23858 na árvore filogenética dos genomas *core*, entretanto, na árvore filogenética dos genomas *accessory*, a *B. naejangsanensis* DSM 23858 se apresenta em um novo ramo, sugerindo que o conjunto de genes *accessory* as fez divergirem.

A análise KEGG mostrou que as vias mais importantes nos genes essenciais (*core*), acessório (*accessory*) e únicos (*unique*) entre as quatro linhagens de *Brevundimonas* selecionadas estão associadas ao "metabolismo". Destes genes, a maioria estava relacionada com "metabolismo de aminoácidos", "metabolismo de carboidratos", e "visão geral", sugerindo papéis importantes na manutenção da função celular e sobrevivência. Os genes únicos, tais como genes específicos da espécie ou da cepa, são os presentes em apenas um genoma, que são normalmente adquiridos por transferência horizontal de genes (COSTA et al., 2020). Curiosamente analisando a distribuição de *clusters* gênicos dentro dos proteoma das bactérias do clado 5, identificamos um maior número de *singletons* na *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov., que estavam relacionados a resistência e virulência. Todas estas características genômicas sugerem uma elevada



versatilidade das espécies *Brevundimonas* na adaptação bem-sucedida a uma vasta gama de ambientes, incluindo ambiente hospitalar. Notavelmente, de acordo com o NCBI, as três cepas mais próximas da *B. brasiliensis* sp. nov. não foram isoladas de amostras humanas e sim do meio ambiente. A *B. naejangsanensis* B1 (SAMN02693465) foi isolada do lodo de um reator de digestão anaeróbica; a *B. naejangsanensis* DSM 23858 (SAMN02441231) foi isolada do solo e a *B. naejangsanensis* FS1091 (SAMN10862243) foi isolada de um ambiente de processamento alimentar.

A seguir, verificamos se a presença de genes de resistência antimicrobiana correspondia aos perfis fenotípicos. Observou-se que o perfil de genes conferindo resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. pode ser associado aos genes *penP*, *bla*<sup>TEM-16</sup>, e *bla*<sup>BKC-1</sup>. O gene *penP* codifica um espectro estreito  $\beta$ -lactamase que apresenta uma hidrólise mais eficaz apenas de penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração (PAS et al., 2017A, PAN et al., 2017B, WONG et al., 2011). O gene *bla*<sup>TEM-16</sup> tem sido relatado numa variedade de isolados clínicos (DAMAS et al., 2022; JACOBY & BUSH, 2016; PLEISS & ZEIL, 2016), e TEM-116 é uma beta-lactamase de espectro estendido (ESBLs) com actividade hidrolítica para ceftazidima, cefotaxima e aztreonam (JEONG et al., 2004; LAHLAOUI et al., 2011). O gene *bla*<sup>BKC-1</sup> codifica uma carbapenemase em *Klebsiellas* brasileiras (BKC-1), que pode conferir resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam, e diminuída susceptibilidade aos carbapenêmicos (BONNIN et al., 2021). Interessante, o BKC-1 foi descrito pela primeira vez no Brasil em três cepas de *K. pneumoniae* (NICOLETTI et al., 2015), e mais recentemente em uma *Citrobacter freundii* também isolada no Brasil (MARTINS et al., 2020B). Portanto, os nossos dados complementam os resultados de outros estudos que mostram que o *bla*<sup>BKC-1</sup> está se propagando a outros agentes patogênicos.

A *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. também apresentou os genes *strA*, *strB*, *aac*(6')-Ib, *aac*(6')-II, que conferem resistência aos aminoglicosídeos. *StrA* e *strB* formam um par de genes *tandem* que codificam aminoglicoside-3"-fosfotransferase e aminoglicoside-6-fosfotransferase, que conferem resistência a muitos antibióticos aminoglicosídicos (LEE et al., 2021, SUNDIN & WANG, 2018). Este par de genes pode ser encontrado em todo o mundo entre diversas bactérias gram-negativas (TANCOS et al., 2016; PETROVA et al., 2008). O gene *aac*(6')-Ib está amplamente distribuído entre os isolados gram-negativos, incluindo *Brevundimonas diminuta* (ALMUZARA et al., 2012), e o principal mecanismo de resistência à amicacina e outros aminoglicosídeos encontrados nessas cepas é a acetilação pelo aminoglicosídeo 6'-N-acetiltransferase tipo Ib (*aac*(6')-Ib) (MAGALLON et al., 2019; RAMIREZ & TOLMASKY, 2017).

A resistência à colistina em bactérias Gram negativas pode ser atribuída à mutação em *PhoPQ*, *PmrAB*, *qseC*, e genes transmitidos por plasmídeos, tais como *mcr* e suas variantes (Nirwan et al.; 2021; Breland et al., 2017; Pitt et al., 2018). A cepa isolada apresentou alterações de aminoácidos na posição 283 em *qseC* (Ile283Leu), e na posição 81 em *phoP* (Arg81Cis). Mutações semelhantes foram relatadas por Pitt et al. (2019), e conferiram resistência à colistina em *Klebsiella pneumoniae*.

A resistência às quinolonas é frequentemente adquirida por mutações nas regiões determinantes de resistência às quinolonas (QRDRs) de genes alvo, tais como *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* (DAMAS et al., 2022; HOPKINS et al., 2005). A nossa análise identificou uma dupla

substituição de aminoácidos em GyrA, de serina para leucina no códon 83 e de ácido aspártico para histidina no 87 (GyrA-S83L-D87H). Estudos relataram que a substituição de Ser83-Leu em GyrA é habitual, contudo, uma mutação adicional no códon 87 está associada a níveis mais elevados de resistência às quinolonas do que as mutações em outros códons dentro do QRDR (MINARINI & DARINI, 2012; HOPKINS et al., 2005; VILA et al., 1999). Embora a subunidade GyrB esteja menos frequentemente associada à resistência às quinolonas (MOMEN et al., 2021), *Brevundimonas brasilienses* sp. nov. apresentou substituições de aminoácidos na posição 466 em GyrB (Glu466-Leu). Resultados similares foram anteriormente relatados em *Brevundimonas diminuta* resistente às quinolonas (HAN & ANDRADE, 2005).

A resistência antimicrobiana também pode ser adquirida pela expressão alterada de poros, levando a uma menor penetração dos antibióticos dentro das bactérias, ou pelo aumento do efluxo de antibióticos da célula bacteriana devido à superexpressão da bomba de efluxo, que atua sinergicamente com mutação na membrana externa (RUSHDY et al., 2013). O gene *oqxBgb* presente em *Brevundimonas brasilienses* sp. nov. codifica proteínas que fazem parte de bombas de efluxo multidrogas responsáveis pela resistência às fluoroquinolonas (SALAM, 2020; COYNE et al., 2010). Os genes do tipo *acrA*, *acrB* e *tolC* encontrados em *B. brasilienses* sp. nov. codificam uma bomba de efluxo tripartida à base de RND (AcrAB-TolC) bem estudada em *Escherichia coli*, e que é capaz de exportar cloranfenicol, fluoroquinolona, tetraciclina, rifampicina, novobiocina, ácido fusídico, ácido nalidíxico e  $\beta$ -lactam antibióticos, corantes e detergentes (PIDDOCK, 2006; FERNANDES et al., 2003; OKUSU et al., 1996). A *Brevundimonas brasilienses* sp. nov. também continha genes *OprM* e *MexL*. *OprM* é o componente de membrana externa presente em *Burkholderia vietnamiensis* e *Pseudomonas aeruginosa* (SHINOY et al., 2013; WONG et al., 2001). Esta proteína de membrana externa é um componente dos sistemas de efluxo MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexJK-OprM e MexVW-OprM, e medeia a resistência multidrogas em *P. aeruginosa* (SCOFFONE et al., 2021; ALCALDE-RICO et al., 2018). Embora os genes *MexAB*, *MexXY*, *MexJK* e *MexVW* não tenham sido encontrados na cepa estudada, o *MexL* codifica um repressor da família *TetR* (*MexL*) que é um regulador negativo da expressão MexJK e pode ser associado à resistência à tetraciclina e à eritromicina (DEPARDIEU et al., 2007; CHUANHUEN et al., 2005; CHUANHUEN et al., 2002).

Além disso, encontramos genes que podem codificar resistência às tetraciclinas (*tet(A)*) (JAHANTIGH et al., 2020; YANG et al., 2021), glicopeptídeo (*vanY*) (STOGIOS & SAVCHENKO, 2020), trimetoprima (*dfrA21*) (AWORH et al., 2021), florfenicol (*florR*) (LU et al., 2018), sulfonamidas (*sul1*) (DOMÍNGUEZ et al., 2019), e peptídeos antimicrobianos catiônicos como a daptomicina (*mprF*) (LIN et al., 2018), contudo, não foram realizados testes de susceptibilidade antimicrobiana, uma vez que estes antibióticos não são uma opção comum utilizada no tratamento de infecções por *Brevundimonas* spp. (RYAN & PEMBROKE, 2018).

Nas espécies de *Brevundimonas*, pouco se sabe sobre os fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade. Em nosso estudo, *Brevundimonas brasilienses* sp. nov. apresentou uma série de genes que codificam fatores de virulência previamente identificados em muitas bactérias, e que estão direta ou indiretamente relacionados à formação do biofilme (*carB*, ZHUO et al., 2015; *ricA*, ADUSEI-DANSO et al., 2019; *msrAB*, SINGH & BHATIA, 2015; *clpP*, WANG et al., 2007), adesão (*cheB*, HUANG et al., 2017; *bpsC*, DIALE et al., 2021), invasão (*fliP* e *fliI*; CORNELIS, 2006; *virB11*, BACON et al. al., 2000), síntese de antígeno

LPS/O (*gmd*, BÖHME et al., 2021), síntese de sideróforo (*dhbA* e *dhbE*, MAY et al., 2001), secreção e transporte (*gspG*, KRALL et al., 2021, *xcpR*, SAEB et al., 2015). Interessante, a cepa isolada também carregava genes que codificam isocitrato liase (*icl*), fator de alongamento Tuf (*tufA*), 2-desidro-3-desoxifosfooctonato aldolase (*kdsA*) e proteína de choque térmico (*htpB*). Da mesma forma, HUANG et al., (2022) relataram a ocorrência desses genes associados à virulência em *Brevundimonas* spp. - *icl*, *tufA*, *kdsA*, *htpB*,

Os Elementos genéticos móveis ou MGEs, desempenham um papel importante na disseminação da resistência a antibióticos e no surgimento de patógenos multidrogas resistentes pelo mundo (NICOLAS et al., 2017). Entretanto, no gênero *Brevundimonas* a literatura de elementos genéticos móveis é escassa. Em nosso estudo, a *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. apresentou muitos MGEs que podem estar relacionados à resistência aos antibióticos e/ou virulência, incluindo transposições, inserções, ICE putativo com T4SS, e IME putativo. O cassete de genes de resistência a antibióticos (*strA*, *strB*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-II*, *sul1*, *dfrA21*), juntamente com a IS6100 e o Tn6001 estavam próximos e localizados no *scaffold* 38. A sequência de inserção IS6100 da família IS6 desempenha um papel na expressão dos genes *strA* e *strB* em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (SUNDIN & BENDER, 1995), e tem sido identificada em muitas outras bactérias (VARANI et al., 2021). Embora o gene *bla*VIM-3 não tenha sido encontrado na cepa estudada, estudos mostraram que o Tn6001 pode conter um integron In450 alojando o *bla*VIM-3 e está associado na disseminação de *Pseudomonas aeruginosa* não susceptíveis a carbapenem (CNSPA) e *P. aeruginosa* extensivamente resistente a drogas (XDRPA) (TSENG et al., 2009; TSENG et al., 2007). BOUALLÈGUE-GODET et al., (2005) mostraram que o *dfrA21*, responsável pela resistência ao trimetoprim, pode ser localizado em plasmídeos e inserido como um único cassete de resistência num integron classe I de *Salmonella enterica*. O gene *aac(6')-Ib*, responsável pela maioria das cepas resistentes a amicacina, encontra-se normalmente em *integrons*, *transposons*, plasmídeos, e cromossomos de diferentes espécies de bactérias (RAMIREZ et al., 2013; RAMIREZ et al., 2010; REEVES et al., 2020).

*Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. também apresentou ISKpn23, ICE putativo com T4SS, próximos à genes de resistência (*bla*<sup>BKC-1</sup> e *floR*) e genes de virulência (*tufA* e/ou *virB11*). Estudos demonstraram que o ISKpn23 desempenha um papel importante na expressão do *bla*<sup>BKC-1</sup> em *Klebsiella pneumoniae* (NICOLETTI et al., 2015; MARTINS et al., 2022A). O gene *floR* tem sido descrito em um pequeno plasmídeo p1807 (SUN et al., 2022) de *Glaesserella parasuis*, e em regiões de multidrogas resistência de um Tn4371-like incompleto, e de ICEs no cromossomo de *Pseudomonas aeruginosa* (QIAN et al., 2021). O gene *virB11* de virulência da cepa estudada estava associado com IME e ICE putativo com T4SS. *Campylobacter jejuni* carrega o gene *virB11* localizado dentro do plasmídeo pVir, que codifica vários genes que são homólogos a um sistema de secreção do tipo IV (SIERRA-ARGUELLO et al., 2021; BACON et al., 2000). Nosso estudo não detectou sequências plasmídicas no sequenciamento de genoma completo (WGS), portanto foi incerto se muitos genes de virulência e resistência estavam localizados em plasmídeos. Além disso, não foi possível correlacionar todos os genes de resistência e virulência encontrados com os MGEs devido a falta de dados científicos na literatura.

## 6. CONCLUSÃO

Em conclusão, o estudo identificou e caracterizou uma nova espécie de *Brevundimonas*, capaz de infectar pacientes na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal. Uma vez que os casos de infecção por *Brevundimonas* estão sendo relatados com uma maior frequência, este estudo forneceu informações valiosas sobre esta nova espécie que podem ser úteis na vigilância, particularmente em ambientes de cuidados de saúde. Além disso, esses dados podem fornecer um impulso para uma investigação mais aprofundada sobre a plasticidade dos genomas *Brevundimonas* e o papel que desempenham na virulência, persistência e resistência aos antibióticos.

## 7. REFERÊNCIAS

ABDULLAH, Saja Ridha Jassim Albo. Study the Antibacterial Effects of Silver Nanoparticles on Gene Expression of Some Resistant Genes Among Multidrug Resistant Bacteria. 2021. Tese de Doutorado. College of Veterinary Medicine Department of Microbiology Study the Antibacterial Effects of Silver Nanoparticles on Gene Expression of Some Resistant Genes Among Multidrug Resistant Bacteria A Thesis Submitted to the College of Veterinary Medicine in Al-Qasim Green University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Veterinary Medicine\Veterinary Microbiology By Saja Ridha Jassim Albo Abdullah B. Sc in Microbiology, College of Science, University of Babylon.

ABRAHAM, Wolf-Rainer et al. *Brevundimonas halotolerans* sp. nov., *Brevundimonas poindexterae* sp. nov. and *Brevundimonas staleyi* sp. nov., prosthecate bacteria from aquatic habitats. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 60, n. 8, p. 1837-1843, 2010.

ADUSEI-DANSO, Felix et al. Structure-function studies of the *Bacillus subtilis* Ric proteins identify the Fe-S cluster-ligating residues and their roles in development and RNA processing. *Mbio*, v. 10, n. 5, p. e01841-19, 2019.

ALCALDE-RICO, Manuel et al. Role of the multidrug resistance efflux pump MexCD-OprJ in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing response. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 2752, 2018.

ALLARD, Marc W. Commentary: The Future of Whole-Genome Sequencing for Public Health and the Clinic. *Journal of clinical microbiology*, v. 54, n. 8, p. 1946-1948, 2016.

ALMUZARA, Marisa N. et al. First report of an extensively drug-resistant VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Brevundimonas diminuta* clinical isolate. *Journal of clinical microbiology*, v. 50, n. 8, p. 2830-2832, 2012.

ANDERSON, Michael et al. Averting the AMR crisis: What are the avenues for policy action for countries in Europe?. 2019.

ANTIPOV, Dmitry et al. plasmidSPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data. *Bioinformatics*, v. 32, n. 22, p. 3380-3387, 2016.

ARONSON, Jeffrey K. (Ed.). *Meyler's side effects of drugs: the international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions*. Elsevier, 2015.

AWORH, Mabel Kamweli et al. Genetic relatedness of multidrug resistant *Escherichia coli* isolated from humans, chickens and poultry environments. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v. 10, p. 1-13, 2021.

- AYOUB MOUBARECK, Carole. Polymyxins and bacterial membranes: a review of antibacterial activity and mechanisms of resistance. *Membranes*, v. 10, n. 8, p. 181, 2020.
- AZIZ, Ramy K. et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2008.
- BACON, David J. et al. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infection and immunity*, v. 68, n. 8, p. 4384-4390, 2000.
- BANKEVICH, Anton et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012.
- BERGLUND, Björn. Acquired resistance to colistin via chromosomal and plasmid-mediated mechanisms in *Klebsiella pneumoniae*. *Infectious Microbes & Diseases*, v. 1, n. 1, p. 10-19, 2019.
- BEVERIDGE, Terry J. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, v. 76, n. 3, p. 111-118, 2001.
- BI, Dexi et al. ICEberg: a web-based resource for integrative and conjugative elements found in Bacteria. *Nucleic acids research*, v. 40, n. D1, p. D621-D626, 2012.
- BINDA, Elisa; MARINELLI, Flavia; MARCONE, Giorgia Letizia. Old and new glycopeptide antibiotics: action and resistance. *Antibiotics*, v. 3, n. 4, p. 572-594, 2014.
- BLAIR, Jessica MA; RICHMOND, Grace E.; PIDDOCK, Laura JV. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future microbiology*, v. 9, n. 10, p. 1165-1177, 2014.
- BÖHME, Katja et al. The Small Protein YmoA Controls the Csr System and Adjusts Expression of Virulence-Relevant Traits of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 706934, 2021.
- BONNIN, Remy A. et al. Genetic diversity, biochemical properties, and detection methods of minor carbapenemases in Enterobacterales. *Frontiers in Medicine*, p. 1061, 2021.
- BORTOLAIA, Valeria et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 75, n. 12, p. 3491-3500, 2020.
- BOUALLÈGUE-GODET, Olfa et al. Nosocomial outbreak caused by *Salmonella enterica* serotype Livingstone producing CTX-M-27 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a neonatal unit in Sousse, Tunisia. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 1037-1044, 2005.
- BRELAND, Erin J. et al. The histidine residue of QseC is required for canonical signaling between QseB and PmrB in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 199, n. 18, p. e00060-17, 2017.

CANTALAPIEDRA, Carlos P. et al. eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. *Molecular biology and evolution*, v. 38, n. 12, p. 5825-5829, 2021.

CAO, Huiling et al. *Brevundimonas diminuta* bacteremia in a man with myelodysplastic syndromes. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, v. 58, n. 3, p. 384, 2015.

CHANDRA, Abhilash et al. *Brevundimonas diminuta* infection in a case of nephrotic syndrome. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, v. 60, n. 2, p. 279, 2017.

CHANDRA, Abhinav B.; CHANDRA, Preeti A.; CHAPNICK, Edward K. Bacteremia caused by *Brevundimonas vesicularis* in a patient with biliary pancreatitis. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, v. 18, n. 1, p. 54-55, 2010.

CHAUDHARI, Narendrakumar M.; GUPTA, Vinod Kumar; DUTTA, Chitra. BPGA-an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. *Scientific reports*, v. 6, n. 1, p. 24373, 2016.

CHEN, Lihong et al. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. *Nucleic acids research*, v. 44, n. D1, p. D694-D697, 2016.

CHI, Chih-yu et al. *Brevundimonas* bacteremia: two case reports and literature review. *Scandinavian journal of infectious diseases*, v. 36, n. 1, p. 59-61, 2004.

CHOWDHURY, Nandan et al. Identification of AcrAB-TolC efflux pump genes and detection of mutation in efflux repressor AcrR from omeprazole responsive multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates causing urinary tract infections. *Microbiology insights*, v. 12, p. 1178636119889629, 2019.

CHRISTENSEN, Søren Brøgger. Drugs that changed society: History and current status of the early antibiotics: Salvarsan, sulfonamides, and  $\beta$ -lactams. *Molecules*, v. 26, n. 19, p. 6057, 2021.

CHUANCHUEN, Rungtip et al. Molecular characterization of MexL, the transcriptional repressor of the mexJK multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 49, n. 5, p. 1844-1851, 2005.

CHUANCHUEN, Rungtip; NARASAKI, Craig T.; SCHWEIZER, Herbert P. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *Journal of bacteriology*, v. 184, n. 18, p. 5036-5044, 2002.

CIMMINO, T.; ROLAIN, J.-M. Whole genome sequencing for deciphering the resistome of *Chryseobacterium indologenes*, an emerging multidrug-resistant bacterium isolated from a cystic fibrosis patient in Marseille, France. *New microbes and new infections*, v. 12, p. 35-42, 2016.

Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). CLSI, 2021. M100Ed33 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd Edition. Disponível em: <<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>>. Acesso em: 25 mar. 2023.

CONESA, Ana; GÖTZ, Stefan. Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International journal of plant genomics*, v. 2008, 2008.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, Robert E. *The cell: a molecular approach*. Sinauer Associates. Sunderland, MA, 2000.

CORNAGLIA, Giuseppe et al. Diffusion of carbapenems through the outer membrane of enterobacteriaceae and correlation of their activities with their periplasmic concentrations. *Microbial drug resistance*, v. 2, n. 2, p. 273-276, 1996.

CORNELIS, Guy R. The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, n. 11, p. 811-825, 2006.

COSTA, Sávio Souza et al. First steps in the analysis of prokaryotic pan-genomes. *Bioinformatics and Biology Insights*, v. 14, p. 1177932220938064, 2020.

COX, Georgina; WRIGHT, Gerard D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 303, n. 6-7, p. 287-292, 2013.

COYNE, Sébastien et al. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 54, n. 10, p. 4389-4393, 2010.

DAI, Hang et al. Multilocus sequence analysis for the taxonomic updating and identification of the genus *Proteus* and reclassification of *Proteus* genospecies 5 O'Hara et al. 2000, *Proteus cibarius* Hyun et al. 2016 as later heterotypic synonyms of *Proteus terrae* Behrendt et al. 2015. *BMC microbiology*, v. 20, p. 1-10, 2020.

DAMAS, Marcelo Silva Folhas et al. Whole genome sequencing of the multidrug-resistant *Chryseobacterium indologenes* isolated from a patient in Brazil. *Frontiers in medicine*, v. 9, 2022.

DAS, Nilanjana et al. An overview of cephalosporin antibiotics as emerging contaminants: a serious environmental concern. *3 Biotech*, v. 9, p. 1-14, 2019.

DASGUPTA, Amitava. Advances in antibiotic measurement. *Advances in clinical chemistry*, v. 56, p. 75, 2012.

DAVIES, Julian. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, v. 264, n. 5157, p. 375-382, 1994.



DEMAIN, Arnold L.; ELANDER, Richard P. The  $\beta$ -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 75, p. 5-19, 1999.

DEPARDIEU, Florence et al. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clinical microbiology reviews*, v. 20, n. 1, p. 79-114, 2007.

DEVER, Laura A.; DERMODY, Terence S. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Archives of internal medicine*, v. 151, n. 5, p. 886-895, 1991.

DIALE, Mamonokane Olga; KAYITESI, Eugenie; SEREPA-DLAMINI, Mahloro Hope. Genome in silico and in vitro analysis of the probiotic properties of a bacterial endophyte, *Bacillus paranthracis* strain mhsd3. *Frontiers in Genetics*, p. 2108, 2021.

DOMÍNGUEZ, Mariana et al. Occurrence of transferable integrons and *sul* and *dfr* genes among sulfonamide-and/or trimethoprim-resistant bacteria isolated from Chilean salmonid farms. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 748, 2019.

DONOWITZ, G. R.; MANDELL, G. L. Beta-lactam antibiotics: part one. *N Engl J Med*, v. 318, p. 419-26, 1988.

DRLICA, Karl. Mechanism of fluoroquinolone action. *Current opinion in microbiology*, v. 2, n. 5, p. 504-508, 1999.

EL SALABI, Allaaeddin; WALSH, Timothy R.; CHOUCHANI, Chedly. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Critical reviews in microbiology*, v. 39, n. 2, p. 113-122, 2013.

EPAND, Richard M. et al. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1858, n. 5, p. 980-987, 2016.

Fabian, B. K., Foster, C., Asher, A. J., Elbourne, L., Cain, A. K., Hassan, K. A., Tetu, S. G., & Paulsen, I. T. (2021). Elucidating Essential Genes in Plant-Associated *Pseudomonas protegens* Pf-5 Using Transposon Insertion Sequencing. *Journal of bacteriology*, 203(7), e00432-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00432-20>

FÀBREGA, Anna et al. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial biotechnology*, v. 2, n. 1, p. 40-61, 2009.

FARRIS, James S. Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *The American Naturalist*, v. 106, n. 951, p. 645-668, 1972.

FELDGARDEN, Michael et al. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Scientific reports*, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.

FERNANDES, Pedro; FERREIRA, Bruno Sommer; CABRAL, Joaquim Manuel Sampaio. Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. *International journal of antimicrobial agents*, v. 22, n. 3, p. 211-216, 2003.

FLORIS, Lauren; CLUCK, David; SINGLETON, Abby. Understanding antimicrobial resistance. *US Pharmacist*, v. 45, n. 4, p. HS-10, 2020.

FOUNOU, Luria L.; FOUNOU, Raspail C.; ESSACK, Sabiha Y. Antimicrobial resistance in the farm-to-plate continuum: More than a food safety issue. *Future science OA*, v. 7, n. 5, p. FSO692, 2021.

FOURMY, Dominique et al. Structure of the A site of *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science*, v. 274, n. 5291, p. 1367-1371, 1996.

GALLAGHER, Jason C.; MACDOUGALL, Conan. *Antibiotics simplified*. Jones & Bartlett Learning, 2022.

GARAU, Javier et al. Fourth-generation cephalosporins: a review of in vitro activity, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical utility. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 3, p. s87-s101, 1997.

GARCÍA-GALÁN, M<sup>a</sup> Jesús; DÍAZ-CRUZ, M. Silvia; BARCELÓ, Damià. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 27, n. 11, p. 1008-1022, 2008.

GAUTAM, Sanjay S. et al. A step-by-step beginner's protocol for whole genome sequencing of human bacterial pathogens. *Journal of Biological Methods*, v. 6, n. 1, 2019.

GERMOVSEK, Eva; BARKER, Charlotte I.; SHARLAND, Mike. What do I need to know about aminoglycoside antibiotics?. *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, v. 102, n. 2, p. 89-93, 2017.

GIACOBBE, D. R. et al. Rapid microbiological tests for bloodstream infections due to multidrug resistant Gram-negative bacteria: therapeutic implications. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 26, n. 6, p. 713-722, 2020.

GILAD, Jacob et al. Hospital-acquired *Brevundimonas vesicularis* septicaemia following open-heart surgery: case report and literature review. *Scandinavian journal of infectious diseases*, v. 32, n. 1, p. 90-91, 2000.

GILES, Julie A. et al. Quinolone resistance-determining region mutations and por type of *Neisseria gonorrhoeae* isolates: resistance surveillance and typing by molecular methodologies. *The Journal of infectious diseases*, v. 189, n. 11, p. 2085-2093, 2004.

GILLIS, Monique et al. Polyphasic taxonomy. In: Bergey's Manual® of systematic bacteriology. 2nd edn. Volume 2: The proteobacteria. Part A: Introductory essays. Springer, New York, NY, 2005. p. 43-48.

GOMBAČ, Mitja et al. *Brevundimonas vesicularis* septicaemia in a kid with congenital goitre. *Slovenian Veterinary Research*, v. 53, n. 3, p. 175-179, 2016.

GRANT, Jason R.; STOTHARD, Paul. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic acids research*, v. 36, n. suppl\_2, p. W181-W184, 2008.

GREER, Nickie D. Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylicycline class of antibiotics. In: *Baylor University Medical Center Proceedings*. Taylor & Francis, 2006. p. 155-161.

GRISSA, Ibtissem; VERGNAUD, Gilles; POURCEL, Christine. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic acids research*, v. 35, n. suppl\_2, p. W52-W57, 2007.

GUINDON, Stéphane et al. Estimating maximum likelihood phylogenies with PhyML. *Bioinformatics for DNA sequence analysis*, p. 113-137, 2009.

GUPTA, Puneet K. et al. Hospital acquired urinary tract infection by multidrug-resistant *Brevundimonas vesicularis*. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, v. 57, n. 3, p. 486, 2014A.

GUPTA, Sushim Kumar et al. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 58, n. 1, p. 212-220, 2014B.

GUREVICH, Alexey et al. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, v. 29, n. 8, p. 1072-1075, 2013.

HAN, Xiang Y.; ANDRADE, Roberto A. *Brevundimonas diminuta* infections and its resistance to fluoroquinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 55, n. 6, p. 853-859, 2005.

HANDSCHUH, Harald et al. Assessment of the bacterial diversity of aircraft water: identification of the frequent fliers. *PLoS One*, v. 12, n. 1, p. e0170567, 2017.

HAYASHI SANT'ANNA, Fernando et al. Genomic metrics made easy: what to do and where to go in the new era of bacterial taxonomy. *Critical reviews in microbiology*, v. 45, n. 2, p. 182-200, 2019.

HOPKINS, Katie L.; DAVIES, Robert H.; THRELFALL, E. John. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International journal of antimicrobial agents*, v. 25, n. 5, p. 358-373, 2005.

HU, Siren et al. New insights into the threshold values of multi-locus sequence analysis, average nucleotide identity and digital DNA–DNA hybridization in delineating *Streptomyces* species. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 2022.

HUA, Xiaoting et al. BacAnt: a combination annotation server for bacterial DNA sequences to identify antibiotic resistance genes, integrons, and transposable elements. *Frontiers in microbiology*, v. 12, p. 649969, 2021.

HUANG, Lixing et al. mcp, aer, cheB, and cheV contribute to the regulation of *Vibrio alginolyticus* (ND-01) adhesion under gradients of environmental factors. *MicrobiologyOpen*, v. 6, n. 6, p. e00517, 2017.

HUANG, Zhenzhou et al. Comparative Genomic Analysis Reveals Potential Pathogenicity and Slow-Growth Characteristics of Genus *Brevundimonas* and Description of *Brevundimonas pishanensis* sp. nov. *Microbiology Spectrum*, v. 10, n. 2, p. e02468-21, 2022.

JACOBY, G. A.; BUSH, K. The Curious Case of TEM-116. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 60, 2016.

JAHANTIGH, Mohammad et al. Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. *BMC Veterinary Research*, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2020.

JANDA, J. Michael; ABBOTT, Sharon L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, v. 45, n. 9, p. 2761-2764, 2007.

JEONG, Seok Hoon et al. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey. *Journal of clinical microbiology*, v. 42, n. 7, p. 2902-2906, 2004.

JIA, Baofeng et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, p. gkw1004, 2016.

JUBEH, Buthaina; BREIJYEH, Zeinab; KARAMAN, Rafik. Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. *Molecules*, v. 25, n. 12, p. 2888, 2020.

KANEHISA, Minoru; GOTO, Susumu. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2000.

KAPOOR, Garima; SAIGAL, Saurabh; ELONGAVAN, Ashok. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, v. 33, n. 3, p. 300, 2017.

KARADAG, N. et al. Spectrum of *Brevundimonas vesicularis* infections in neonatal period: a case series at a tertiary referral center. *Infection*, v. 40, p. 509-515, 2012.

KARADAG, N. et al. Spectrum of *Brevundimonas vesicularis* infections in neonatal period: a case series at a tertiary referral center. *Infection*, v. 40, p. 509-515, 2012.

KATOH, Kazutaka; TOH, Hiroyuki. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics*, v. 26, n. 15, p. 1899-1900, 2010.

KÖSER, Claudio U. et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. 2012.

KOTRA, Lakshmi P.; HADDAD, Jalal; MOBASHERY, Shahriar. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 44, n. 12, p. 3249-3256, 2000.

KRALL, Lars Johannes et al. Invasiveness of *Escherichia coli* is associated with an IncFII plasmid. *Pathogens*, v. 10, n. 12, p. 1645, 2021.

KRAUSE, Kevin M. et al. Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 6, n. 6, p. a027029, 2016.

KUMAR, Ayush; SCHWEIZER, Herbert P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced drug delivery reviews*, v. 57, n. 10, p. 1486-1513, 2005.

KUMAR, Varun; GERA, Rajesh. Isolation of a multi-trait plant growth promoting *Brevundimonas* sp. and its effect on the growth of Bt-cotton. *3 Biotech*, v. 4, p. 97-101, 2014.

KWIATKOWSKA, Brygida et al. Immune system as a new therapeutic target for antibiotics. 2013.

LAHLAOUI, H. et al. First detection of TEM-116 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a *Providencia stuartii* isolate from a Tunisian hospital. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 29, n. 3, p. 258-261, 2011.

LAMBERT, Peter A. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced drug delivery reviews*, v. 57, n. 10, p. 1471-1485, 2005.

LEE, Myungjin; SRINIVASAN, Sathiyaraj; KIM, Myung Kyum. New taxa in Alphaproteobacteria: *Brevundimonas olei* sp. nov., an esterase-producing bacterium. *The Journal of Microbiology*, v. 48, p. 616-622, 2010.

LEE, Young Sun et al. Identification of *strA-strB* genes in streptomycin-resistant *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Biovar 2 strains isolated in Korea. *The Plant Pathology Journal*, v. 37, n. 5, p. 489, 2021.

- LEFORT, Vincent; DESPER, Richard; GASCUEL, Olivier. FastME 2.0: a comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Molecular biology and evolution*, v. 32, n. 10, p. 2798-2800, 2015.
- LI, Xian-Zhi; NIKAIDO, Hiroshi. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, v. 69, p. 1555-1623, 2009.
- LIN, Lee-Chung et al. Novel single-nucleotide variations associated with vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Infection and drug resistance*, v. 11, p. 113, 2018.
- LIU, Lina et al. Genome-Based Taxonomy of *Brevundimonas* with Reporting *Brevundimonas huaxiensis* sp. nov. *Microbiology Spectrum*, v. 9, n. 1, p. e00111-21, 2021.
- LIU, Yang; LAI, Qiliang; SHAO, Zongze. A multilocus sequence analysis scheme for phylogeny of *Thioclava* bacteria and proposal of two novel species. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 1321, 2017.
- LORUSSO, Andre Bittencourt et al. Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 24, p. 15779, 2022.
- LU, Binghuai et al. Pleuritis due to *Brevundimonas diminuta* in a previously healthy man. *Journal of medical microbiology*, v. 62, n. 3, p. 479-482, 2013.
- LU, Junwan et al. Spread of the florfenicol resistance floR gene among clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v. 7, p. 1-9, 2018.
- LUPANDE-MWENEBITU, David et al. First Isolation and Clinical Case of *Brevundimonas diminuta* in a Newborn with Low Birth Weight, in Democratic Republic of Congo: A Case Report. *Medicina*, v. 57, n. 11, p. 1227, 2021.
- MADHAV, Archana; WILL, Robert C.; MUTREJA, Ankur. The Evolution of Microbial Defence Systems Against Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Resistance: Global Challenges and Future Interventions*, p. 1-31, 2020.
- MAGALLON, Jesus et al. Restoration of susceptibility to amikacin by 8-hydroxyquinoline analogs complexed to zinc. *PLoS One*, v. 14, n. 5, p. e0217602, 2019.
- MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.
- MAKII, Jason M.; TRAEGER, Jessica; DELIC, Justin. Antimicrobial prophylaxis. In: *Essentials of Evidence-Based Practice of Neuroanesthesia and Neurocritical Care*. Academic Press, 2022. p. 77-88.

MARCDANTE, Karen; KLIEGMAN, Robert M. Nelson Essentials of Pediatrics-E-Book: First South Asia Edition. Elsevier Health Sciences, 2016.

MARTINS, Willames MBS et al. Detection of BKC-1 in *Citrobacter freundii*: A clue to mobilisation in an IncQ1 plasmid carrying bla BKC-1. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 56, n. 1, p. 106042-106042, 2020B.

MARTINS, Willames MBS et al. Role of IS Kpn23 in bla BKC-1 expression and mobilization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 66, n. 4, p. e00875-21, 2022A.

MARTUCCI, A. et al. Recent advances in clean-up strategies of waters polluted with sulfonamide antibiotics: a review of sorbents and related properties. *Mineralogical Magazine*, v. 78, n. 5, p. 1115-1140, 2014.

MASOUDZADEH, Nasrin et al. Biosorption of cadmium by *Brevundimonas* sp. ZF12 strain, a novel biosorbent isolated from hot-spring waters in high background radiation areas. *Journal of hazardous materials*, v. 197, p. 190-198, 2011.

MAY, Jurgen J.; WENDRICH, Thomas M.; MARAHIEL, Mohamed A. The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2, 3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 10, p. 7209-7217, 2001.

MEIER-KOLTHOFF, Jan P. et al. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC bioinformatics*, v. 14, p. 1-14, 2013.

MEIER-KOLTHOFF, Jan P. et al. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. D1, p. D801-D807, 2022.

MEIER-KOLTHOFF, Jan P.; GÖKER, Markus. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature communications*, v. 10, n. 1, p. 2182, 2019.

MENUET, Magalie et al. First isolation of two colistin-resistant emerging pathogens, *Brevundimonas diminuta* and *Ochrobactrum anthropi*, in a woman with cystic fibrosis: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2008.

MINARINI, Luciene AR; DARINI, Ana Lucia C. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 1309-1314, 2012.

MINARINI, Luciene AR; DARINI, Ana Lucia C. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 1309-1314, 2012.

MINGEOT-LECLERCQ, Marie-Paule; GLUPCZYNSKI, Youri; TULKENS, Paul M. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 43, n. 4, p. 727-737, 1999.

MOHAPATRA, Saswat S.; DWIBEDY, Sambit K.; PADHY, Indira. Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. *Journal of Biosciences*, v. 46, n. 3, p. 85, 2021.

MOMEN, Ghizlane et al. Molecular characterization of mutations associated with resistance to second line drugs in *Mycobacterium tuberculosis* patients from Casablanca, Morocco. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 63, 2021.

MORAN-GILAD, Jacob. Whole genome sequencing (WGS) for food-borne pathogen surveillance and control—taking the pulse. *Eurosurveillance*, v. 22, n. 23, p. 30547, 2017.

MORIN, Robert B.; GORMAN, Marvin (Ed.). *The Biology of B-Lactam Antibiotics*. Elsevier, 2014.

NELSON, David W.; MOORE, John E.; RAO, Juluri R. Antimicrobial resistance (AMR): significance to food quality and safety. *Food quality and safety*, v. 3, n. 1, p. 15-22, 2019.

NICOLAS, Emilien et al. Unlocking Tn3-family transposase activity in vitro unveils an asymmetric pathway for transposome assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 114, n. 5, p. E669-E678, 2017.

NICOLETTI, Adriana Giannini et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 59, n. 9, p. 5159-5164, 2015.

NIRWAN, Pushpa Kumari et al. Mutations in two component system (PhoPQ and PmrAB) in colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* from North Indian tertiary care hospital. *The Journal of Antibiotics*, v. 74, n. 7, p. 450-457, 2021.

NISHINO, Kunihiro et al. Function and inhibitory mechanisms of multidrug efflux pumps. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 737288, 2021.

O'NEILL, Jim et al. Review on antimicrobial resistance. *Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations*, v. 2014, n. 4, 2014.

OBERHELMAN, Richard A.; HUMBERT, James R.; SANTORELLI, Frances W. *Pseudomonas vesicularis* causing bacteremia in a child with sickle cell anemia. *Southern medical journal*, v. 87, n. 8, p. 821-822, 1994.

OKUSU, Haruko; MA, Dzwokai; NIKAIDO, Hiroshi. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *Journal of bacteriology*, v. 178, n. 1, p. 306-308, 1996.



OTTO, L. ANNE et al. *Pseudomonas vesicularis* from cervical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 7, n. 4, p. 341-345, 1978.

OVUNG, Aben; BHATTACHARYYA, Jhimli. Sulfonamide drugs: Structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical Reviews*, v. 13, n. 2, p. 259-272, 2021.

PAGE, Andrew J. et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, v. 31, n. 22, p. 3691-3693, 2015.

PAN, Xuehua et al. Crystallographic snapshots of class A  $\beta$ -lactamase catalysis reveal structural changes that facilitate  $\beta$ -lactam hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 292, n. 10, p. 4022-4033, 2017B.

PAN, Xuehua et al. Modified penicillin molecule with carbapenem-like stereochemistry specifically inhibits class C  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 61, n. 12, p. e01288-17, 2017A.

PANDEY, Neelanjana; CASCELLA, Marco. Beta lactam antibiotics. In: *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing, 2022.

PANDIT, Rahul T. *Brevundimonas diminuta* keratitis. *Eye & contact lens*, v. 38, n. 1, p. 63-65, 2012.

PAUTER, Katarzyna; SZULTKA-MŁYŃSKA, Małgorzata; BUSZEWSKI, Bogusław. Determination and identification of antibiotic drugs and bacterial strains in biological samples. *Molecules*, v. 25, n. 11, p. 2556, 2020.

PEARSON, James P.; VAN DELDEN, Christian; IGLEWSKI, Barbara H. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *Journal of bacteriology*, v. 181, n. 4, p. 1203-1210, 1999.

PELLETIER, Jesse S.; IDE, Takeshi; YOO, Sonia H. *Brevundimonas vesicularis* keratitis after laser in situ keratomileusis. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v. 36, n. 2, p. 340-343, 2010.

PENNA, Vessoni Thereza Christina; MARTINS, Silva Alzira Maria; MAZZOLA, Priscila Gava. Identification of bacteria in drinking and purified water during the monitoring of a typical water purification system. *BMC Public Health*, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2002.

PEREIRA-MAIA, Elene Cristina et al. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. *Química nova*, v. 33, p. 700-706, 2010.

PÉREZ-TRALLERO, Emilio; IGLESIAS, Luis. Tetraciclina, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, v. 21, n. 9, p. 520-529, 2003.

PETROVA, M. A. et al. Association of the strA-strB genes with plasmids and transposons in the present-day bacteria and in bacterial strains from permafrost. *Russian Journal of Genetics*, v. 44, p. 1116-1120, 2008.

PIDDOCK, Laura JV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical microbiology reviews*, v. 19, n. 2, p. 382-402, 2006.

PITT, Miranda E. et al. Multifactorial chromosomal variants regulate polymyxin resistance in extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial genomics*, v. 4, n. 3, 2018.

PITT, Miranda E. et al. Octapeptin C4 and polymyxin resistance occur via distinct pathways in an epidemic XDR *Klebsiella pneumoniae* ST258 isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 74, n. 3, p. 582-593, 2019.

PITT, Miranda E. et al. Octapeptin C4 and polymyxin resistance occur via distinct pathways in an epidemic XDR *Klebsiella pneumoniae* ST258 isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 74, n. 3, p. 582-593, 2019.

PLEISS, Juergen; ZEIL, Catharina. Reply to "The Curious Case of TEM-116". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 11, p. 7001, 2016.

POOLE, Keith. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of medicine*, v. 39, n. 3, p. 162-176, 2007.

POSADA, David. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, 2008.

PURSSELL, E. Antimicrobials. *Understanding Pharmacology in Nursing Practice*. Springer, Cham. DOI, v. 10, p. 978-3, 2020.

QIAN, Changrui et al. Identification of floR Variants Associated With a Novel Tn 4371-Like Integrative and Conjugative Element in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, p. 685068, 2021.

QUAINOO, Scott et al. Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: the future of nosocomial outbreak analysis. *Clinical microbiology reviews*, v. 30, n. 4, p. 1015-1063, 2017.

RAMIREZ, María S.; NIKOLAIDIS, Nikolas; TOLMASKY, Marcelo E. Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the aac (6')-Ib paradigm. *Frontiers in microbiology*, v. 4, p. 121, 2013.

RAMIREZ, Maria S.; TOLMASKY, Marcelo E. Amikacin: uses, resistance, and prospects for inhibition. *Molecules*, v. 22, n. 12, p. 2267, 2017.

RAMIREZ, Maria S.; TOLMASKY, Marcelo E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates*, v. 13, n. 6, p. 151-171, 2010.

REARDON, Sara. WHO warns against 'post-antibiotic' era. *Nature*, v. 15, p. 135-8, 2014.

REEVES, Craig M. et al. Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase Type Ib [AAC (6')-Ib]-Mediated Aminoglycoside Resistance: Phenotypic Conversion to Susceptibility by Silver Ions. *Antibiotics*, v. 10, n. 1, p. 29, 2020.

REYGAERT, Wanda C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, v. 4, n. 3, p. 482, 2018.

REYNOLDS, Peter E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 8, p. 943-950, 1989.

ROSS, Karen et al. TnCentral: a prokaryotic transposable element database and web portal for transposon analysis. *MBio*, v. 12, n. 5, p. e02060-21, 2021.

ROSSI, Flávia; ANDREAZZI, Denise. Overview of tigecycline and its role in the era of antibiotic resistance. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 10, p. 203-216, 2006.

RUSHDY, Abeer Ahmed et al. Contribution of different mechanisms to the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Salmonella enterica*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 4, p. 431-437, 2013.

RYAN, Michael P.; PEMBROKE, J. Tony. *Brevundimonas* spp: Emerging global opportunistic pathogens. *Virulence*, v. 9, n. 1, p. 480-493, 2018.

RYU, Seung Hyun et al. *Brevundimonas aveniformis* sp. nov., a stalked species isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, n. 7, p. 1561-1565, 2007.

SAEB, Amr TM; DAVID, Satish Kumar; AL-BRAHIM, Hissa. Correction to: "In Silico Detection of Virulence Gene Homologues in the Human Pathogen *Sphingomonas* Spp.". *Evolutionary Bioinformatics Online*, v. 11, p. 1, 2015.

SALAM, Lateef Babatunde. Unravelling the antibiotic and heavy metal resistome of a chronically polluted soil. *3 Biotech*, v. 10, n. 6, p. 238, 2020.

SAMTIYA, Mrinal et al. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: Trends, Mechanisms, Pathways, and Possible Regulation Strategies. *Foods*, v. 11, n. 19, p. 2966, 2022.

SCHAECHTER, Moselio. *Encyclopedia of microbiology*. Academic Press, 2009.

SCHWARZE, Katharina et al. Are whole-exome and whole-genome sequencing approaches cost-effective? A systematic review of the literature. *Genetics in Medicine*, v. 20, n. 10, p. 1122-1130, 2018.

SCOFFONE, Viola Camilla et al. Role of RND efflux pumps in drug resistance of cystic fibrosis pathogens. *Antibiotics*, v. 10, n. 7, p. 863, 2021.

SEEMANN, Torsten. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, v. 30, n. 14, p. 2068-2069, 2014.

SEGERS, Paul et al. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Büsing, Döll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., Respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 44, n. 3, p. 499-510, 1994.

SHANG, Shih-Ta et al. Invasive *Brevundimonas vesicularis* bacteremia: Two case reports and review of the literature. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 45, n. 6, p. 468-472, 2012.

SHINOY, Minu et al. Immunoproteomic analysis of proteins expressed by two related pathogens, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*, during human infection. *PLoS One*, v. 8, n. 11, p. e80796, 2013.

SHRIRAM, Varsha et al. Inhibiting bacterial drug efflux pumps via phyto-therapeutics to combat threatening antimicrobial resistance. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 2990, 2018.

SHUTTER, M. C.; AKHONDI, H. Tetracycline.[Updated 2022 Jul 4]. *Stat Pearls* [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing, 2022.

SIERRA-ARGUELLO, Yuli Melisa et al. Identification of pathogenic genes in *Campylobacter jejuni* isolated from broiler carcasses and broiler slaughterhouses. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 4588, 2021.

SIGUIER, Patricia et al. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic acids research*, v. 34, n. suppl\_1, p. D32-D36, 2006.

SILHAVY, Thomas J.; KAHNE, Daniel; WALKER, Suzanne. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 2, n. 5, p. a000414, 2010.

SIMÃO, Felipe A. et al. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, v. 31, n. 19, p. 3210-3212, 2015.

SINGH, Shweta; BHATIA, B. D. *Brevundimonas* Septicemia: A Rare Infection with Rare Presentation. *Indian Pediatr*, v. 52, n. 10, p. 901, 2015.

SNITKIN, Evan S. et al. Genomic insights into the fate of colistin resistance and *Acinetobacter baumannii* during patient treatment. *Genome research*, v. 23, n. 7, p. 1155-1162, 2013.

SOFER, Yael; ZMIRA, Samra; AMIR, Jacob. *Brevundimonas vesicularis* septic arthritis in an immunocompetent child. *European journal of pediatrics*, v. 166, p. 77-78, 2007.

SOTO, Sara M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, v. 4, n. 3, p. 223-229, 2013.

SOUSA, Joana et al. Analytical methods for determination of new fluoroquinolones in biological matrices and pharmaceutical formulations by liquid chromatography: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 403, p. 93-129, 2012.

STEWART, Karen. Gram positive vs gram negative. From *Technology Networks*, 2019.

STOGIOS, Peter J.; SAVCHENKO, Alexei. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Science*, v. 29, n. 3, p. 654-669, 2020.

SUAREZ, Cristina; GUDIOL, Francesc. Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*, v. 27, n. 2, p. 116-129, 2009.

SULTAN, Insha et al. Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: a bacterial perspective. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 2066, 2018.

SUN, Huarun et al. Genomic insight into the integrative conjugative elements from ICEHp1 family. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, 2022.

SUNDIN, George W.; BENDER, Carol L. Expression of the *strA-strB* streptomycin resistance genes in *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* and characterization of IS6100 in *X. campestris*. *Applied and environmental microbiology*, v. 61, n. 8, p. 2891-2897, 1995.

SUNDIN, George W.; WANG, Nian. Antibiotic resistance in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of phytopathology*, v. 56, p. 161-180, 2018.

SWALLOW, Steven. Fluorine in medicinal chemistry. *Progress in medicinal chemistry*, v. 54, p. 65-133, 2015.

TANCOS, K. A. et al. Prevalence of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* in New York apple orchards. *Plant disease*, v. 100, n. 4, p. 802-809, 2016.

TAO, Wen-Tao et al. Exploring the interaction between vancomycin/teicoplanin and receptor binding domain (RBD) of SARS-CoV-2. *Frontiers in Chemistry*, v. 8, p. 639918, 2021.

THRUM, H. Classes of antibiotics and their mechanisms of action. *Zeitschrift fur die gesamte innere Medizin und ihre Grenzgebiete*, v. 32, n. 14, p. Suppl: 209-14, 1977.

TINDALL, Brian J. et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 60, n. 1, p. 249-266, 2010.

TORTORA, Gerard J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. *Microbiologia* 12a. Artmed Editora, 2016.

TRIPATHI, Nishant; SAPRA, Amit. Gram staining. 2020.

TSENG, Sung-Pin et al. Dissemination of transposon Tn 6001 in carbapenem-non-susceptible and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Taiwan. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 64, n. 6, p. 1170-1174, 2009.

TSENG, Sung-Pin et al. Tn 6001, a transposon-like element containing the bla VIM-3-harboring integron In450. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 51, n. 11, p. 4187-4190, 2007.

TSUBOUCHI, Taishi et al. *Brevundimonas abyssalis* sp. nov., a dimorphic prosthecate bacterium isolated from deep-subsea floor sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 63, n. Pt\_6, p. 1987-1994, 2013.

TSUBOUCHI, Taishi et al. *Brevundimonas denitrificans* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from deep seafloor sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 64, n. Pt\_11, p. 3709-3716, 2014.

ULUSEKER, Cansu et al. A review on occurrence and spread of antibiotic resistance in wastewaters and in wastewater treatment plants: mechanisms and perspectives. *Frontiers in microbiology*, v. 12, p. 717809, 2021.

VAHID, B. *Brevundimonas vesicularis* bacteremia following allogenic bone marrow transplantation. *Int J Infect Dis*, v. 5, n. 1, 2006.

VAN HOEK, Angela HAM et al. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology*, v. 2, p. 203, 2011.

VARANI, Alessandro et al. The IS 6 family, a clinically important group of insertion sequences including IS 26. *Mobile Dna*, v. 12, p. 1-18, 2021.

VARDANYAN, Ruben; HRUBY, Victor. *Synthesis of best-seller drugs*. Academic press, 2016.

VARDANYAN, Ruben; HRUBY, Victor. *Synthesis of best-seller drugs*. Academic press, 2016.

VERRAES, Claire et al. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International journal of environmental research and public health*, v. 10, n. 7, p. 2643-2669, 2013.

VERRAES, Claire et al. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International journal of environmental research and public health*, v. 10, n. 7, p. 2643-2669, 2013.

VILA, J.; RUIZ, J.; NAVIA, M. M. Molecular bases of quinolone resistance acquisition in gram-negative bacteria. In: Recent research developments in antimicrobial agents & chemotherapy (Vol. 3 (1999); Part II). 1999. p. 323-344.

WALLER, Derek G.; SAMPSON, Anthony; HITCHINGS, Andrew. Medical pharmacology and therapeutics E-Book. Elsevier Health Sciences, 2021.

WANG, Chongzhen et al. Role of ClpP in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes and infection*, v. 9, n. 11, p. 1376-1383, 2007.

WANG, Chunrong et al. Biodegradation characterization and immobilized strains' potential for quinoline degradation by *Brevundimonas* sp. K4 isolated from activated sludge of coking wastewater. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 79, n. 1, p. 164-170, 2015.

WANG, Hui et al. oprM as a new target for reversion of multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 60, n. 3, p. 275-282, 2010.

WANG, Jiewei et al. *Brevundimonas viscosa* sp. nov., isolated from saline soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 62, n. Pt\_10, p. 2475-2479, 2012.

WANG, Tingting et al. Whole genome sequencing uncovers a novel IND-16 metallo- $\beta$ -lactamase from an extensively drug-resistant *Chryseobacterium indologenes* strain J31. *Gut Pathogens*, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2016.

WEIGEL, Linda M.; STEWARD, Christine D.; TENOVER, Fred C. gyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 10, p. 2661-2667, 1998.

WEXLER, Hannah M. Anaerobic Infections: A Clinical Overview. *Molecular Medical Microbiology*, p. 875-897, 2015.

WHITE, Allison; HUGHES, James M. Critical importance of a one health approach to antimicrobial resistance. *EcoHealth*, v. 16, p. 404-409, 2019.

WILLIAMS, J. D.  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. *International journal of antimicrobial agents*, v. 12, p. S3-S7, 1999.

WONG, Kendy KY et al. Evaluation of a structural model of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprM, an efflux component involved in intrinsic antibiotic resistance. *Journal of bacteriology*, v. 183, n. 1, p. 367-374, 2001.

WONG, Wai-Ting et al. Increased structural flexibility at the active site of a fluorophore-conjugated  $\beta$ -lactamase distinctively impacts its binding toward diverse cephalosporin antibiotics. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 36, p. 31771-31780, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global action plan on antimicrobial resistance. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis. Joint News Release; 2019.

XU, Ling et al. OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic acids research*, v. 47, n. W1, p. W52-W58, 2019.

YANG, Mei-Li et al. Case report: infective endocarditis caused by *Brevundimonas vesicularis*. *BMC infectious diseases*, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2006.

YANG, Qin et al. A novel plasmid from *Aerococcus urinaeequi* of porcine origin co-harboring the tetracycline resistance genes tet (58) and tet (61). *Veterinary Microbiology*, v. 257, p. 109065, 2021.

YOO, Seu Hee et al. Liver abscess caused by *Brevundimonas vesicularis* in an immunocompetent patient. *Journal of medical microbiology*, v. 61, n. 10, p. 1476-1479, 2012.

YOON, Seok-Hwan et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 67, n. 5, p. 1613, 2017.

ZANKARI, Ea et al. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 68, n. 4, p. 771-777, 2013.

ZAVASCKI, Alexandre Prehn et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 60, n. 6, p. 1206-1215, 2007.

ZENG, Daina et al. Approved glycopeptide antibacterial drugs: mechanism of action and resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 6, n. 12, p. a026989, 2016.

ZHANG, Cheng et al. Enhancement of dicarboximide fungicide degradation by two bacterial cocultures of *Providencia stuartii* JD and *Brevundimonas naejangsanensis* J3. *Journal of Hazardous Materials*, v. 403, p. 123888, 2021.

ZHOU, XiaoGuang et al. The next-generation sequencing technology: a technology review and future perspective. *Science China Life Sciences*, v. 53, p. 44-57, 2010.

ZHOU, You et al. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic acids research*, v. 39, n. suppl\_2, p. W347-W352, 2011.



ZHUO, Tao et al. Molecular study on the carAB operon reveals that carB gene is required for swimming and biofilm formation in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *BMC microbiology*, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2015.

ZUCKERMAN, Jane N. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, Sarah S. Long, Larry K. Pickering, Charles G. Proben (Eds.), Churchill Livingstone Elsevier Inc., Philadelphia (2008), 1618 pp., with illus. Hardback, GBP 146.00, ISBN: 978-0-443-06687-0. 2009.

## 8. ANEXO 1

### 1 *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov.: a new multidrug-resistant species isolated from a patient in 2 **Brazil**

3 Gabriela Guerrero Soares<sup>a+</sup>, Emeline Boni Campanini<sup>a+</sup>, Roumayne Lopes Ferreira<sup>a+</sup>, Marcelo Silva  
4 Folhas Damas<sup>a+</sup>; Saulo Henrique Rodrigues<sup>a</sup>, Leslie Camelo Campos<sup>b</sup>, Jucimária Dantas Galvão<sup>b</sup>, Andrea  
5 Soares da Costa Fuentes<sup>a</sup>, Caio César de Melo Freire<sup>a</sup>, Iran Malavazi<sup>a</sup>, André Pitondo-Silva<sup>c</sup>, Anderson  
6 Ferreira da Cunha<sup>a</sup>, Maria-Cristina da Silva Pranchevicius<sup>a,d\*</sup>

7  
8 <sup>a</sup> Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

9 <sup>b</sup> Laboratório Central de Saúde Pública do Tocantins, Palmas, TO, Brazil

10 <sup>c</sup> Programas de Pós-graduação em Odontologia e Tecnologia Ambiental, Universidade de Ribeirão Preto,  
11 Ribeirão Preto, Brazil.

12 <sup>d</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Biodiversidade Tropical - BIOTROP, Universidade Federal  
13 de São Carlos, São Carlos, Brazil.

14  
15 <sup>+</sup> These authors contributed equally to this work.

16  
17 Running Head: Multidrug resistant *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov.

#### 18 19 \* **Corresponding author:**

20 Maria Cristina da Silva Pranchevicius

21 Departamento de Genética e Evolução. Universidade Federal de São Carlos. Rod. Washington Luis, km  
22 235, São Carlos-SP 13565-905, Brazil

23 phone +55 16 98191 7525, fax: +55 16 3351 8377

24 Email address: mcspranc@gmail.com

#### 25 26 **Authors**

27 Gabriela Guerrero Soares; phone; +55-47-99119-4833; email: [gabiguerrerasoares@gmail.com](mailto:gabiguerrerasoares@gmail.com)

28 Emeline Boni Campanini; phone: +55-16-99122-6697; e-mail: [emelinebc@gmail.com](mailto:emelinebc@gmail.com)

29 Roumayne Lopes Ferreira: +55-62-98121-8171; e-mail: [roumaynelopes@gmail.com](mailto:roumaynelopes@gmail.com)

30 Marcelo Silva Folhas Damas; phone: +55-11-98106-7853; e-mail: [marcelofolhas@gmail.com](mailto:marcelofolhas@gmail.com)

31 Saulo Henrique Rodrigues; phone: +55-18-99642-9391; email: [saulo@estudante.ufscar.br](mailto:saulo@estudante.ufscar.br)

32 Leslie Camelo Campos; phone: +55-63-99241-7003; e-mail: [leslieccampos@hotmail.com](mailto:leslieccampos@hotmail.com)

33 Jucimária Dantas Galvão; phone+ +55- 63-98120-4444; email: [lacento.diretoria@gmail.com](mailto:lacento.diretoria@gmail.com)

34 Andrea Soares da Costa Fuentes; phone: +55-16-98132-5381; email: [andreaufscar@gmail.com](mailto:andreaufscar@gmail.com)

35 Caio César de Melo Freire: phone: +55-11-98527-6035; e-mail: [caiomfreire@gmail.com](mailto:caiomfreire@gmail.com)

36 Iran Malavazi; phone: +55-16-99118-4767; e-mail: [imalavazi@ufscar.br](mailto:imalavazi@ufscar.br)

37 André Pitondo-Silva; phone: +55-16-98121-9019; e-mail: [andre@pitondo.com.br](mailto:andre@pitondo.com.br)

38 Anderson Ferreira da Cunha; phone: +55-16-997655987; e-mail: [anderf2611@gmail.com](mailto:anderf2611@gmail.com)

39 Maria Cristina da Silva Pranchevicius; phone: +55-16-98191-7525; email: [mcspranc@gmail.com](mailto:mcspranc@gmail.com)

40

41

42

43

44

**45 ABSTRACT**

46 To increase knowledge on *Brevundimonas* pathogens, we conducted in-depth genomic and phenotypic  
47 characterization of a *Brevundimonas* strain isolated from cerebrospinal fluid of a patient admitted in a  
48 neonatal intensive care unit. The strain was identified as a member of the genus *Brevundimonas* based on  
49 VITEK-2 system results and 16S rDNA sequence, and presented a multidrug resistance profile (MDR).  
50 Several molecular and biochemical tests were used to characterize and identify the species for in-depth  
51 results. The draft genome assembly of the isolate has a total length of 3,261,074 bp and G+C of 66.86%,  
52 similar to other species of the genus. Multilocus sequence analysis, Type (Strain) Genome Server, digital  
53 DNA-DNA hybridization, and average nucleotide identity confirmed that the *Brevundimonas* sp. studied  
54 represents a distinct species, for which we propose the name *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. In silico  
55 analysis detected antimicrobial resistance genes (AMRGs) mediating resistance to  $\beta$ -lactams (*penP*,  
56 *bla*<sub>TEM-16</sub>, *bla*<sub>BKC-1</sub>) and aminoglycosides (*strA*, *strB*, *aac*(6')-Ib, *aac*(6')-II). We also found AMRGs  
57 encoding the AcrAB efflux pump that confers resistance to a broad spectrum of antibiotics. Colistin and  
58 quinolone resistance can be attributed to mutation in *qseC/phoP* and GyrA/GyrB, respectively.  
59 *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. genome contained copies of T4SS-type ICEs; IME; Tn3-type, and  
60 IS3, IS6, IS5, IS1380 families, suggesting an important role in the development and dissemination of  
61 antibiotic resistance. The isolate presented a range of virulence-associated genes related to biofilm  
62 formation, adhesion, and invasion that can be relevant for its pathogenicity. Our findings provide a wealth  
63 of data to hinder the transmission of MDR *Brevundimonas* and highlight the need for monitoring and  
64 identifying new bacterial species in hospital environments..

65

**66 IMPORTANCE**

67 *Brevundimonas* species is considered an opportunistic human pathogen that can cause multiple types of  
68 invasive and severe infections in patients with underlying pathologies. Treatment of these pathogens has  
69 become a major challenge because many isolates are resistant to most antibiotics used in clinical practice.  
70 Furthermore, there are no consistent therapeutics results demonstrating the efficacy of antibacterial agents.  
71 Although considered a rare pathogen, recent studies have provided evidence of the emergence of  
72 *Brevundimonas* in clinical settings. Hence, we identified a novel pathogenic bacterium, *Brevundimonas*  
73 *brasiliensis* sp. nov., that presented a multidrug-resistance(MDR) profile and carried diverse genes related  
74 to drug resistance, virulence, and mobile genetic elements. Such data can serve as a baseline for  
75 understanding the genomic diversity, adaptation, evolution, and pathogenicity of MDR *Brevundimonas*.

76

77

78

## 79 INTRODUCTION

80 *Brevundimonas* spp. are aerobic Gram-negative, non-fermenting rods, belonging to the *Caulobacteraceae*  
81 family (1). Usually, they are isolated from various environments, such as purified water (2), deep subsea  
82 floor sediment (3, 4), black sand (5), and soils (6, 7). Although these species might be part of human  
83 microbiota, the role that they play in human patients without significant diseases has not been determined  
84 (8, 9).

85 Since *Brevundimonas* spp. are considered an opportunistic human pathogens in immunocompromised  
86 patients (10), they can cause multiple types of infections including septicaemia (11), pneumonia/pleuritis  
87 (12), endocarditis (13, 14), meningitis (15), keratitis (16), and urinary tract infections (17, 18). To date,  
88 there are 34 species with a valid species published with a correct name within the genus *Brevundimonas*  
89 (<http://www.bacterio.net/brevundimonas.html>). New species belonging to the genus *Brevundimonas* have  
90 been isolated from a variety of sources, including the feces of a patient with diarrhea (*Brevundimonas*  
91 *pishanensis* sp. nov.) (19) and the blood of a patient with hepatocellular carcinoma (*Brevundimonas*  
92 *huaxiensis*) (20).

93 Whole-genome sequencing (WGS) has become a valuable tool for enhancing diagnostic, public health  
94 surveillance, and antimicrobial drug resistance (21). It can also be used for identifying novel and rare  
95 species, and resolving inconsistencies among commonly used methods of bacterial identification, such as  
96 16S rRNA sequence analysis and phenotyping (22). Average nucleotide identity (ANI) and digital DNA-  
97 DNA hybridization (dDDH) are WGS-based experimental methods developed to determine the similarity  
98 between two genomes (23), that have been widely used as a gold standard for species delineation (24).

99 In this study, an MDR *Brevundimonas* sp., isolated from the cerebrospinal fluid sample of a hospitalized  
100 infant, could not be identified by VITEK-2 system or by 16S rRNA sequence analysis. Thus, we identified  
101 a novel species, *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov., using traditional methods of bacterial identification  
102 and multiple comparative genomic analyses. Moreover, the draft genome of *Brevundimonas brasiliensis*  
103 sp. nov. was subjected to an in-depth analysis of genes related to the pathogenicity, antimicrobial  
104 resistance, and mobile genetic elements.

## 106 MATERIAL AND METHODS

### 107 Bacterial Isolate

108 *Brevundimonas* sp. was recovered from the cerebrospinal fluid of an infant hospitalized at the Neonatal  
109 Intensive Care Unit (NICU) of the Hospital Geral de Palmas, Palmas, Tocantins, Brazil. This isolate was  
110 sent to the Central Laboratory of Public Health of Tocantins-Brazil (LACEN/TO/BR), a health-care  
111 facility from the Brazilian Ministry of Health that receives samples of antimicrobial resistance for  
112 surveillance. Sample was sent for identification and antimicrobial susceptibility testing using Vitek 2

113 system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). However, species identification of *Brevundimonas* sp. was  
114 not possible by Vitek system. Identification of bacterial isolate of the genus and species-level was further  
115 analyzed using Whole Genome Sequencing (WGS) by our research group. We also used 49 representative  
116 and complete sequences of *Brevundimonas* type strains in this study. Data is available in GenBank as of  
117 June 2022 ([https:// itwww.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](https://itwww.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)), see (**Supplementary Table S1**).

### 118 **Antimicrobial Susceptibility**

119 The drug susceptibility of *Brevundimonas* sp was performed using the VITEK 2 system (bioMérieux, Inc.,  
120 Hazelwood, MO, United States) following the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines  
121 (Clinical and Laboratory Standards Institute) (25). Phenotypic detection for the production of  
122 carbapenemases was carried out by modified Hodge test, synergy test, and the ethylenediaminetetraacetic  
123 acid (EDTA) test under the CLSI guidelines (25) as described elsewhere (26–29). Minimum inhibitory  
124 concentration (MICs) of colistin and tigecycline was determined by the broth microdilution method and  
125 results were interpreted based on the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing  
126 (EUCAST, 2021, available at: <https://www.eucast.org/>) criteria. *Brevundimonas* sp. isolate was tested for  
127 susceptibility against 16 antibiotics: amikacin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefepime, cefoxitin,  
128 ceftazidime, ceftriaxone, cefuroximeaxetil, ciprofloxacin, colistin, ertapenem, gentamicina, imipenem,  
129 meropenem, piperacillin/tazobactam, and tigecycline. Multidrug-resistant (MDR) *Brevundimonas* sp.  
130 isolate was defined by non-susceptibility to at least one agent in three or more antibiotic categories (30).

### 131 **DNA isolation and Library preparation for sequencing**

132 Total DNA extraction was performed using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega,  
133 Madison, WI, United States). The quantification of DNA was made using NanoVue Plus (GE Healthcare  
134 Life Sciences, Marlborough, MA, United States). The integrity of DNA was verified by electrophoresis  
135 analysis. Bacterial DNA concentration was also measured fluorometrically (Qubit® 3.0, kit Qubit®  
136 dsDNA Broad Range Assay Kit, Life Technologies, Carlsbad, CA, United States). Samples were  
137 submitted to sequencing reaction using 1 ng of total DNA. Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina,  
138 San Diego, CA, United States) was used for library production. The libraries were amplified using a short  
139 cycle PCR program. In the first PCR step, the Index 1 (i7) adapters and Index 2 (i5) adapters were added  
140 for sequencing cluster generation. The purification of the Library was performed using 0.6x Agencourt  
141 AMPure XP beads (Beckman Coulter). For checking the Library quality and DNA fragments size,  
142 samples were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gel. The Libraries were quantified with a  
143 fluorometric method Qubit® 3.0 using Qubit® dsDNA Broad Range Assay Kit (Life Technologies,  
144 Carlsbad, CA, United States) and normalized to 4 nM by Standard Dilution Method. Libraries were  
145  
146

147 pooled, denatured by addition of 0.2 N NaOH, and diluted to the final concentration of 1.8 pM. A PhiX  
148 control reaction was made in the final concentration of 1.5 pM. The run-length was a paired-end run of  
149 75 cycles for each read ( $2 \times 75$ ), plus up to eight cycles each for two index reads.

### 151 **Genome assembly and annotation**

152 Data quality of raw reads was checked with FastQC v0.11.4 and trimmed to improve quality with  
153 Trimgalore v0.4.1. Genome assembly was performed with SPAdes 3.2 (31), and assembly statistics were  
154 accessed with the QUAST (32). Plasmid detection and assembly attempts were performed by  
155 plasmidSPAdes (<http://spades.bioinf.spbau.ru/plasmidSPAdes>) (33). The circle map plot was obtained  
156 using the CGView server (34) (<https://cgview.ca/>). The assembled draft genome was annotated using the  
157 rapid prokaryotic genome annotation program, PROKKA (35), and the Rapid Annotation using  
158 Subsystem Technology RAST server (36) (<https://rast.nmpdr.org/>). The BUSCO program was used to  
159 evaluate the completeness of the assembled genome (37).

### 161 **COG eggNOG e GO annotation**

162 The COG (Clusters of Orthologous Group) functional categories were annotated through online tool  
163 EggNOG-mapper (38) (<http://eggnog-mapper.embl.de>). The Gene Ontology (GO) was annotated through  
164 Blast2GO (39).

### 166 **16S rRNA Phylogeny and Biochemical identification**

167 We identified a 16s rRNA gene sequence from our genome annotation. All curated 16S rRNA gene  
168 sequences from genus *Brevundimonas* were searched for in the GenBank database (**Supplementary**  
169 **Table S2**). The nucleotide sequences of 16s rRNA were aligned using multiple sequence alignment  
170 software (MAFFT) (40) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>). The construction of the Maximum  
171 Likelihood (ML) phylogenetic tree and the selection of the best assembly model were performed using  
172 the PhyML ver.3.0 program (41) and JModelTest (42), respectively.

173 *Brevundimonas* sp. was subjected to biochemical tests using the Bactray I, II, III Systems according to  
174 the manufacturer's instructions (LaborClin, Paraná, Brazil). The results were compared with other  
175 *Brevundimonas* species reported in the literature.

### 177 **Multi-locus sequence analysis (MLSA)**

178 Multilocus sequence analysis (MLSA) was conducted with five housekeeping genes – *atpD* (beta subunit  
179 of ATP synthase), *ileS* (isoleucina--tRNA ligase), *recA* (RecA protein), *rpoC* (DNA-directed RNA  
180 polymerase beta subunit), and *trpB* (beta chain of tryptophan synthase), which were retrieved from

181 *Brevundimonas* reference species and the complete genome from the NCBI (National Center for  
182 Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (**Supplementary Table S3**). The genes  
183 were aligned and concatenated in the following order: *atpD*, *recA*, *ileS*, *rpoC* and *trpB*. The phylogenetic  
184 tree was built with the PhyML ver.3.0 program (41) based on the best model chosen by JModelTest (42).

### 185 186 **Nucleotide Identity (ANI) and digital DNA-DNA hybridization (dDDH)**

187 Reference and complete genomes of *Brevundimonas* species were retrieved from the NCBI  
188 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (**Supplementary Table S4**). The average Nucleotide Identity (ANI) was  
189 calculated using the OrthoANI algorithm (43) (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>). The digital DNA-  
190 DNA hybridization (dDDH) was calculated *in silico* by the Genome to Genome Distance Calculator  
191 (GGDC 3.0) using the BLAST method (44) (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#>). The NCBI online tool  
192 CIMminer (<https://discover.nci.nih.gov/cimminer/oneMatrix.do>) was used to build a Heatmap with the  
193 orthoANI and dDDH results.

### 194 195 **TYGS (Type (Strain) Genome Server) analysis**

196 For phylogenetic inference of our strain *Brevundimonas* sp. the TYGS (Type (Strain) Genome Server)  
197 (45) (<https://tygs.dsmz.de> accessed 01 August 2022) was used against reference genomes of the genus  
198 *Brevundimonas* (**Supplementary Table S5**).

### 199 200 **Core and Accessory genome comparison**

201 The complete and reference genomes of the genus *Brevundimonas* (**Supplementary Table S6**) were  
202 analyzed together with *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. using the Roary pipeline to infer the core and  
203 accessory genome trees (46).

### 204 205 **Genome analysis with Orthovenn and KEEG**

206 For these analyses, we used the species closest to our strain according to the genomic core tree. Whole  
207 genome comparison analysis of *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. against the selected genomes of  
208 *Brevundimonas* was performed using the OrthoVenn2 web server (<https://orthovenn2.bioinfotoolkits.net/>)  
209 (47). Annotation of high-level functions and other high-throughput metabolism data was performed by  
210 Bacterial Pangenome Analysis Pipeline (BPGA) (48), against the Kyoto Encyclopedia Genomics and  
211 Genes Database (KEGG) (49). Thus, detailed identification of core genes, accessory genes and unique  
212 genes was possible.

## 215 **Characterization of resistance and virulence factors**

216 The draft genome was screened for the presence of antimicrobial resistance (AMR) genes with the Rapid  
217 Annotation using Subsystem Technology server, RAST (36) (<https://rast.nmpdr.org/>). Blast was  
218 performed using two databases: the comprehensive antibiotic resistance database (CARD;  
219 <https://card.mcmaster.ca/>) (50) and the antibiotic resistance gene ANNotation (ARG-ANNOT database)  
220 (51).

221 Online tools were used for better annotation of resistance genes: CARDonline (<https://card.mcmaster.ca/>),  
222 ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (52), and BacAnt (<http://bacant.net>) (53). The  
223 AMRFinderPlus 3.10 (54) tool developed by NCBI was used with Blast pipeline. Annotation of resistance  
224 factors was also done by the Kyoto Encyclopedia Genomics and Genes Database (KEGG) (49), using the  
225 online tool BlastKOALA (<http://www.kegg.jp/blastkoala/>) for functional characterization of resistance  
226 genes.

227 Flouquinolone resistance genes were identified from Prokka annotation and manually aligned (55) to the  
228 sequences *gyrA* of *E. coli* (AAG57360.1); *gyrA* *Salmonella enterica* (AAL21173.1); *gyrB* of *E. coli*  
229 (AAG58896.1), and *gyrB* of *Salmonella enterica* (AAL22694.1). Genes providing colistin resistance were  
230 identified by Prokka annotation and mutations were identified manually.

231 Virulence factors of the strain were annotated with Blast, using the Virulence Factor Database (56).

## 233 **Mobile genetic elements (MGE)**

234 For identification of integrons, transposons TnCentral (<https://tncentral.ncc.unesp.br/>) (57) was used. The  
235 ISfinder online server was used to identify insertion sequences in our genome  
236 (<https://isfinder.biotoul.fr/blast.php>) (58). To identify mobile elements and analyze their relationship with  
237 virulence and resistance factors, we used MGEfinder  
238 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MobileElementFinder/>) from the Technical University of Denmark  
239 (DTU). Integrative and conjugative elements (ICE) were analyzed and identified by ICEfinder (59)  
240 (<https://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/ICEfinder/ICEfinder.html>). Phage analysis was performed using the  
241 PHAge Search Tool (PHAST) (<http://phast.wishartlab.com>) (60), and short palindromic repeats were  
242 studied with CRISPRfinder (<http://crispr.u-psud.fr/Server/CRISPRfinder.php>) (61).

## 244 **Data availability and strain deposition**

245 The raw reads are available in Sequence Read Archive (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) with  
246 Bioproject number PRJNA882454.

## 248 **Submission of the strain in culture collection**



249 This strain was deposited at the Bacteria Collection from Environment and Health (CBAS) of the Oswaldo  
250 Cruz Foundation (FIOCRUZ) (Accession number: CBAS 910).

## 252 **Ethics Statement**

253 In this work, we did not access the medical records of the patient. *Brevundionas* sp. and the anonymous  
254 archival data related to sample type were obtained from the Central Laboratory of Public Health of  
255 Tocantins (LACEN/TO, data's owner). The studies involving human participants were reviewed and  
256 approved by the Committee of Ethics in Human Research of the Federal University of São Carlos  
257 (CEHRFUSC), and the need for informed consent for conducting this study was waived by the committee  
258 (no. 1.595.268). Patient consent was not required since the data presented in this study do not relate to  
259 any specific person or persons. Written informed consent from the participants or their legal guardian/next  
260 of kin was not required to participate in this study in accordance with the national legislation and  
261 institutional requirements. Permission to conduct the present study was obtained from the Health  
262 Department of the State of Tocantins (Secretaria da Saúde do Estado do Tocantins – SESAU) and  
263 LACEN/TO.

## 265 **Funding**

266 This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-Brazil (FAPESP  
267 grant 2020/11964-4 to MCSP, and FAPESP grant 2018/20697-0 to AFC). This study was partially  
268 financed by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-Brazil (FAPESP) as a fellowship  
269 to MSFD (FAPESP fellowship 2018/24213-7), GGS (FAPESP fellowship 2021/08423-4), and by  
270 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brazil as a fellowship to MSFD (CNPq  
271 2022-1/115339). EBC is grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
272 (CAPES) for the post-doctoral fellowship (Finance Code 001).

## 274 **RESULTS**

### 275 **Bacteria Isolation and Antibiotic susceptibility profile**

276 The bacterial isolate was correctly identified at the genus level as *Brevundimonas* sp. through VITEK-2  
277 system. However, this method was not accurate for species-level identification. Antibiotic susceptibility  
278 was also performed using the VITEK 2 system, and the isolate was classified as MDR as it was non-  
279 susceptible to at least three different antimicrobial classes, including Beta-lactam (ampicillin,  
280 ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam, cefuroxime axetil, cefoxitin, ceftazidime, ceftriaxone,  
281 cefepime, ertapenem, imipenem, meropenem); aminoglycosides (amikacin and gentamicin); polymyxin

(colistin), and quinolone (ciprofloxacin) (**Table 1**). *Brevundimonas* sp. showed susceptibility to only tigecycline, an antibiotic belonging to the glycylcycline class.

### Features of the genome assembly

The draft genome size of the *Brevundimonas* sp. comprised 3,261,074 bp, G+C content of 66.86%, 54 scaffolds, and 3,191 genes that covered 89.76% of the genome. Among these genes, 3,140 were coding sequences (CDSs), and 51 non-coding RNAs (including 48 tRNAs and 3 rRNAs) (**Figure 1A and 1B**). A genome analysis of *Brevundimonas* sp. by the RAST Server revealed 278 subsystems classified into 27 categories. Among these categories, the “amino acid and derivatives” subsystem comprised the largest number (248 CDSs), followed by “membrane transport” (148), “carbohydrates” (144), and “protein metabolism” (140). The “virulence, disease, and defense” subsystem accounted for 35 CDSs, being 21 of them were associated to resistance to antibiotics and toxic compounds (16 copper homeostasis, 2 resistance to fluoroquinolones, 1 Beta-lactamase, 1 multidrug resistance efflux pumps, 1 copper tolerance) while 14 were related with invasion and intracellular resistance (**Figure 1C**). The data of Whole-Genome Sequencing, circular representations and subsystem category distributions are shown in **Figure 1**.

The distribution of protein-coding genes into the Cluster of Orthologous Groups (COG) functional category showed a total of 2,743 genes (**Figure 1D**). The majority of known protein-coding genes were associated to “metabolism” (n = 1013; 36.93%), followed by those related with “cellular processes and signaling” (n = 666; 24.28%), “information storage and processing” (n = 508; 18.51%). The number of genes associated with “unknown functions” was 556 (20.26%) and with defense was 34 (1.23%) v (**Figure 1D**).

### Phylogenetic tree and Biochemical analysis

The genomic sequence of *Brevundimonas* sp. presented only one 16S rRNA gene sequence, indicating that the genome assembly was not contaminated by other organisms. Therefore, a phylogenetic tree was constructed based on the 16S rRNA gene sequence (1,459 bp) of our strain and all 16S rRNA gene sequence (n = 44) of known *Brevundimonas* species deposited in GenBank. The 16S rRNA reference sequence of *Henriciella pelagia* strain LA220 was used as an outgroup. The results confirmed that *Brevundimonas* sp. represents a member of the genus *Brevundimonas*. In this initial taxonomic classification, *Brevundimonas* sp. was most related to *Brevundimonas olei* with a sequence identity of 99.71% (with 68.5% bootstrap support), followed by *B. naejangsanensis* (BIO TAS2-2) (**Figure 2A**). To define the characteristics of *Brevundimonas* sp., biochemical tests were performed and compared with *Brevundimonas olei*, *Brevundimonas naejangsanensis*, *Brevundimonas diminuta*, and *Brevundimonas vesiculares* (**Figure 2B**). Unlike *B. olei*, our strain was oxidase positive and motile. The results also

316 showed that *Brevundimonas* sp. had a yellow color, it was catalase positive, and it only assimilated L-  
317 arabibose. The non-utilization of D-mannitol is unique to our strain when compared with other  
318 *Brevundimonas* species. (**Figure 2B**).

### 320 Genetic Relatedness

321 To further determine the taxonomic affiliation of *Brevundimona* sp., a multilocus sequence analysis  
322 (MLSA) was performed with five housekeeping genes found in complete genomic and reference  
323 sequences of *Brevundimonas* (**Supplementary Table S3**). The phylogenetic trees (**Figure 3A**) were  
324 generated based on the concatenated sequences in the following order: *atpD* (1536 bp), *recA* (1080 bp),  
325 *ileS* (2922 bp), *rpoD* (1923 bp), and *trpB* (1224 bp), which yielded an alignment of 8684 pb. The MLSA  
326 tree exhibited the close association between our *Brevundimonas* sp. and *Brevundimonas naejangsanensis*  
327 FS1091 (**Figure 3A**), followed by *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858.

328 To clarify the results of MLSA, ANI and dDDH analyses were performed with the *Brevundimonas* sp.  
329 and all 49 complete genomic and 27 reference sequences from the genus *Brevundimonas* available in  
330 GenBank (**Supplementary Table S4**). In these analyses, the closest fully assembled genome were  
331 *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858 (ANI = 93.15%, dDDH = 63.0%), followed by  
332 *Brevundimonas naejangsanensis* B1 (ANI = 92.60%, dDDH = 67.3%), *Brevundimonas naejangsanensis*  
333 FS1091 (ANI = 92.52%, dDDH = 62.9%), and *Brevundimonas vancouverensis* NCTC9239 (ANI = 89.31%,  
334 dDDH = 54.5%) (**Figure 3B and 3C**). Based on these findings, *Brevundimonas* sp. represents a novel  
335 species (ANI < 95%, dDDH < 70%).

336 A phylogenetic tree based on 19 reference genome sequences and the *Brevundimonas* sp. was constructed  
337 using Type (Strain) Genome Server (TYGS). The TYGS based results showed that *Brevundimonas* sp.  
338 are most closely related to *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858 (**Figure 3D**), with digital DNA-  
339 DNA hybridization (dDDH) values (formula  $d4$ ) of 50.8%, also positioning *Brevundimonas* sp. as a novel  
340 species.

341 Although *Brevundimonas olei* presented >99%, 16S rRNA sequence identity with *Brevundimonas* sp., it  
342 had no housekeeping genes or genome sequence available in genetic sequence database for comparison.  
343 Therefore, *Brevundimonas olei* was not included in MLSA, ANI, dDDH and TYGS analysis.

### 345 Genome Properties and Comparative Functional Analysis

346 To investigate general evolutionary patterns of genomes, we constructed two phylogenetic trees based on  
347 the set of core and accessory genomes of our strain with 49 reference and complete genomes of  
348 *Brevundimonas* deposited in GenBank. The trees were divided into seven main clusters, according to the  
349 topological structure and evolutionary distance. The relative positions of the *Brevundimonas brasiliensis*

350 sp. nov., *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858, *Brevundimonas naejangsanensis* FS1091,  
 351 *Brevundimonas naejangsanensis* B1 species (Clade 5) varied between the two trees. *Brevundimonas*  
 352 *brasiliensis* sp. nov. and *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858 were segregated under a common  
 353 node in the core genome tree, although the strains segregated together under distinct nodes in the  
 354 accessory genome tree (**Figure 4A and 4B**).

355 Next, we compared the gene functional distribution among the four species present in Clade 5 (**Figure**  
 356 **4C and 4D**). The KEGG analysis revealed that 77% (n=1794) of genes were associated with core, 16.3%  
 357 (n=379) with unique, and 6.7% (n=157) with accessory. Genes associated with “metabolism” accounted  
 358 for the largest proportion both in the unique (84.16%; n=319), accessory (70.06%; n=110), and core  
 359 (67.61%, n=1213) genomes. The annotations of these unique genes indicated that most were related to  
 360 “amino acid metabolism” (18.99%; n=72), “carbohydrate metabolism” (14.24%; n=54), and xenobiotics  
 361 biodegradation and metabolism (10.55%, n=40). The core genes were mainly related to “amino acid  
 362 metabolism” (12.93%; n=232), overview (12.21%; n=219), and “carbohydrate metabolism” (11.98%;  
 363 n=215). The accessory genes were associated with “amino acid metabolism” (14.65%, n=23), and  
 364 “carbohydrate metabolism” (12.74%, n=20). The genes involved in “human diseases” (n=176; 7.54%)  
 365 accounted for 6.6% (n=154) in core, 0.6% (n=14) in unique, and 0.34% (n=8) in accessory. Interestingly,  
 366 we found genes related to beta-lactam (5.68%; n=10), vancomycin (2.84%; n=5), and cationic  
 367 antimicrobial peptide (CAMP) resistance (5.68%; n=10) in core gene clusters for human disease.

368 Orthologous gene cluster analysis was also performed among the *B. brasiliensis* sp. nov. and the  
 369 *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858, *B. naejangsanensis* FS1091, and *B. naejangsanensis* B1.  
 370 The four strains shared 1661 orthologous gene clusters. *B. brasiliensis* sp. nov. shared 80 orthologous  
 371 gene clusters with *B. naejangsanensis* DSM 23858, 39 with *B. naejangsanensis* strain FS1091, and 9 with  
 372 *B. naejangsanensis* B1. The number of unique orthologue gene clusters was 11 for *B. brasiliensis* sp., 19  
 373 for *B. naejangsanensis* DSM 23858, 6 for *B. naejangsanensis* FS1091, and none for *B. naejangsanensis*  
 374 B1. The Venn diagram orthologous gene clusters distributed among the four strains is shown in **Figure**  
 375 **4E**. *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. strain contained the highest number of singletons (n=570),  
 376 followed by *B. naejangsanensis* DSM 23858 (n=443), *B. naejangsanensis* strain FS1091 ((n=276), and  
 377 *B. naejangsanensis* B1 (n=126) (**Figure 4F**). The singletons from *B. brasiliensis* sp. presented *strA*, *strB*,  
 378 *aac6'Ib*, *drfA21* genes related to antibiotic resistance; and *virB11*, *cheB*, *mrsA/B* genes associated with  
 379 virulence.

380

### 381 Antibiotic Resistance Genes

382 Resistome analysis revealed the presence of 24 AMRGs that are demonstrated in **Table 1**. *B. brasiliensis*  
 383 sp. nov. carried 3  $\beta$ -lactamase genes (*penP*, *bla*<sub>TEM-16</sub>, and *bla*<sub>BKC-1</sub>) genes; 4 aminoglycosides genes (*strA*,

384 *strB*, *aac(6')-II*, *aac(6')-Ib'*); 2 genes that encode multidrug efflux pumps which confer resistance to  
 385 fluoroquinolones (*OqxBgb* and *adeF*); 3 genes that encode RND-based tripartite efflux pump (*AcrA*,  
 386 *AcrB*, and *TolC*) capable of conferring resistance to a broad spectrum of antibiotics including  $\beta$ -lactams,  
 387 tetracycline, novobiocin, and fluoroquinolones; 2 genes associated to tetracycline and erythromycin  
 388 resistance (*MexL* and *oprM*), 1 tetracycline gene (*tet(A)*), 1 glycopeptide gene (*vanY*), 1 trimethoprim  
 389 gene (*dfrA21*), 1 sulfonamide gene (*sul1*), 1 cationic antimicrobial peptides such as daptomycin (*mprF*)  
 390 and 1 amphenicol gene (*floR*).

391 Additionally, we found amino acid alterations in *PhoP* (Arg81Cis) and *qseC* (Ile283Leu) that mediate  
 392 resistance to colistin antibiotic; double amino acid substitution in *GyrA* (S83L and D87H), and single  
 393 amino acid substitution in *GyrB* (Leu-466), which are associated with quinolones resistance (**Figure S1**  
 394 **Supplementary**).

395

### 396 **Virulence factors**

397 The distribution of genes associated with virulence factors is shown in **Table 2**. *Brevundimonas*  
 398 *brasiliensis* sp. nov. displayed 18 genes that encode virulence-associated factors, including biofilm  
 399 formation (*carB*, *ricA*, *msrAB*, *clpP*), adhesion (*cheB*, *bpsC*), invasion (*FliP*, *FliI*, *virB11*), LPS/O-  
 400 antigen synthesis (*gmd*), synthesis of siderophore (*dhbA*, *dhbE*), isocitrate lyase (*icl*), elongation factor  
 401 Tu (*tufA*), 2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase (*kdsA*), and heat shock protein (*hspB*), secretion  
 402 (*gspG*, *xcpR*).

403

### 404 **Mobile Genetic Elements**

405 The *B. brasiliensis* sp. nov. assembly was also examined for mobile genetic elements. The genome  
 406 contained 2 copies of putative T4SS-type ICEs; 1 putative IME; 10 members (two copies of IS511, two  
 407 copies of ISSp2, and six copies ISR1 of the IS3 family), 3 members (three copies of IS6100) of the IS6  
 408 family, 2 members (2 copies of ISKpn12) of the IS5 family, 1 member (ISKpn23) of IS1380 family; and  
 409 Tn3-type transposable elements, designed TnAsz17.1, Tn5393, Tn6216, Tn6001\_p (**Figure 5A**). Scaffold  
 410 1 contained TnAsz17.1, IS511, *phoP* resistance gene, and *carB* virulence gene. Scaffold 2 contained  
 411 *virB11* virulence gene, 1 IME encoding integrase, *xerC2* recombinase, *traC1*, and it was bordered by a  
 412 15-bp direct repeat (*attL*; 5'-GGCGGTGATCGGCC-3', and *attR*; 5'-GGCGGTGATCGGCC-3') at  
 413 both ends. In scaffold 11, we found a 16-bp direct repeat (*attL*; 5'-GGCGGCGGCGGCGGCG-3') and a  
 414 copy of a *mexL* gene. Scaffold 12 carried one copy of *hspB* virulence gene and elements of the “backbone”  
 415 of integrative and conjugative elements (ICEs), such as type IV secretion systems (T4SSs), *Trb(s)*, *virB(s)*,  
 416 insertions (ISR1), integrase, relaxase, and a 16-bp direct repeat *attR* (5'-GGCGGCGGCGGCGGCG-3').  
 417 Scaffold 15 harbored one copy of ISKpn12 insertion element and 15-bp direct repeat (*attL*; 5'-

418 TGCTGGATCGCGCCG-3'). Scaffold 16 carried one copy of *virB11* virulence gene and elements of the  
419 ICEs. Scaffold 17 contained integrase, relaxase, ISKpn23, *bla*<sub>BKC-1</sub> resistance gene, *tufA* virulence gene,  
420 a 15-bp direct repeat (attR; 5'-TGCTGGATCGCGCCG-3'), and one copy of *floR* resistance bordered the  
421 attR end. Tn6216, a resistance gene, and a virulence gene were present in scaffold 18. The scaffold 18  
422 contained Tn6216, *Oqx*Bgb resistance, and *msrA/B* virulence genes. Scaffold 36 carried only an ISSsp2  
423 element and one copy of a *oprM* resistance gene. Scaffold 38 comprised the transposon-like element  
424 named Tn6001\_p, the insertion sequence IS6100, and *strA*, *strB*, *aac*(6')-Ib, *aac*(6')-II, *sul1*, *dfrA21*  
425 resistance genes (**Figure 5B**). GIs, integrons, and prophages were not identified in the genome of *B.*  
426 *brasiliensis* sp. nov.

427

## 428 **DISCUSSION**

429 The prevalence of certain MDR Gram-negative bacteria is increasing dramatically in patient care settings  
430 (65). Here, we reported a phenotypic and a systematic genomic characterization of a *Brevundimonas*  
431 clinical strain isolated from the cerebrospinal fluid of an infant admitted in NICU. Although it is  
432 considered a rare human pathogen, there has been an increase of infections caused by *Brevundimonas* spp.  
433 in recent years (66, 67), including in hospitalized children. Explanations for this include that babies are  
434 more vulnerable to colonization and infection with pathogens due to an immature immune system. Novel  
435 molecular and phenotypic methods are providing more accurate and robust identification of these  
436 pathogens (68–70).

437 As *Brevundimonas* spp. are becoming known for their resistance properties to many different antibiotics  
438 (10, 71, 72), we analyzed the resistance profile to the antibiotics most commonly used to treat infections  
439 caused by Gram-negative bacteria. The studied *Brevundimonas* sp. was classified as MDR, presenting  
440 resistance to  $\beta$ -lactams, polymyxin, aminoglycosides, and fluoroquinolones. In contrast, we only observed  
441 susceptibility to tigecycline. Although the resistance mechanisms in the *Brevundimonas* genus remain  
442 poorly understood (10), it is known that the resistance profile can be highly varied. For instance,  
443 *Brevundimonas vesicularis* and *Brevundimonas diminuta* are the main species isolated from human  
444 infections (66). Studies have reported that both species may be resistant (17, 71, 72) or susceptible (9, 66,  
445 73) to most antibiotics tested in this study.

446 Since species identification of *Brevundimonas* isolate was not possible with the Vitek 2 system, WGS  
447 was performed on *Brevundimonas* sp. for a more accurate identification and characterization of the isolate.  
448 The genome size and GC content were similar to most of the *Brevundimonas* spp. deposited in NCBI. The  
449 RAST and eggNOG analysis showed the most genes were related to cellular processes, which are essential  
450 to the bacteria (74). Notably, the genes related to the defense mechanisms present in eggNOG, and disease  
451 in RAST analysis were associated with a multidrug resistance profile.

452 Preliminary phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences confirmed that our strain belongs  
453 to the genus *Brevundimonas*. It shared the highest similarity to *Brevundimonas olei* MJ15 (99.71%),  
454 followed by *Brevundimonas naejangsanensis* BIO TAS2-2 (99.37%). Although the 16S rRNA gene is  
455 widely used to differentiate strains at the genus level (75–77), it has poor discriminatory power at the  
456 species level since 16S rRNA genes are identical or highly homologous among different species (78). To  
457 aid bacterial identification, biochemical tests were performed, revealing that our strain is an oxidase  
458 positive and motile bacillus, unlike *Brevundimonas olei*. Multilocus sequence analysis (MLSA) based on  
459 several housekeeping genes has become a high-resolution technique to elucidate taxonomic relationship  
460 and phylogenetic analysis of closely related strains and subspecies (79, 80). The MLSA scheme based on  
461 five housekeeping genes (*atpD*, *recA*, *ileS*, *rpoD*, and *trpB*) showed that the isolate *Brevundimonas* sp.  
462 was clearly separated from *Brevundimonas naejangsanensis* FS1091 and *Brevundimonas*  
463 *naejangsanensis* DSM 23858, indicating a novel species within the *Brevundimonas* genus.

464 ANI or dDDH analysis has been most widely used as a gold standard for species delineation (24). Studies  
465 have reported that dDDH is considered necessary when strains share more than 97% 16S rRNA gene  
466 sequence similarity (81, 82), as it was observed for *Brevundimonas* sp, *Brevundimonas olei*, and  
467 *Brevundimonas naejangsanensis* BIO TAS2-2. To provide more accurate evidence for supporting the  
468 strain *Brevundimonas* sp. is a novel species, average nucleotide identity (ANI) and digital DDH (dDDH)  
469 analyses were performed with the *Brevundimonas* sp. and complete genomic and reference sequences  
470 from the genus *Brevundimonas* available in GenBank. Our data revealed that values for ANI (<95%) and  
471 dDDH (<70 %) were lower than the generally accepted for species-level, showing that the isolate  
472 *Brevundimonas* sp. represents a novel species. To further validate our results, a phylogenetic tree inferred  
473 with genome BLAST distance phylogeny (GBDP) was constructed with the Type (Strain) Genome Server  
474 (TYGS), using the strain *Brevundimonas* sp. and reference sequences deposited in GenBank. The TYGS  
475 results also indicate that the strain *Brevundimonas* sp. is a novel species. Based on these findings, the  
476 name *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. was proposed.

477 To gain insights into similarity and distance within the genus *Brevundimonas*, we constructed two  
478 phylogenetic trees based on the set of core and accessory genomes (19). *Brevundimonas brasiliensis* sp.  
479 nov., *B. naejangsanensis* DSM 23858, *B. naejangsanensis* strain FS1091, and *B. naejangsanensis* B1  
480 were grouped into the same clade in both trees. However, the phylogenetic trees presented a different  
481 topology. *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. showed evolutionary relatedness to the *B.*  
482 *naejangsanensis* DSM 23858 on the core gene tree, but they were no longer the sisters on the accessory  
483 genome tree, suggesting that non-core genes were likely to make them diverged. KEGG analysis showed  
484 that most important pathways in core, accessory, and unique genes among four *Brevundimonas* strains are  
485 associated with “metabolism”. Among these genes, most were related to “amino acid metabolism”,

486 “carbohydrate metabolism”, and “overview”, suggesting important roles in the maintenance of cellular  
487 function and survival. Important drug resistance genes were identified in unique gene clusters for human  
488 disease. *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov. also harbored the highest number of singletons among the  
489 four strains, presenting specific genes associated with resistance and virulence genes. Singleton genes  
490 such as species-specific or strain-specific genes are those present in only one genome, which are usually  
491 acquired by horizontal gene transfer (83). All these genomic features suggest a high versatility of  
492 *Brevundimonas* species in adapting to a wide range of environments, including healthcare environments.  
493 We checked if the presence of AMRGs corresponded to phenotypic profiles and observed that the  $\beta$ -  
494 lactams in *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov can be associated to *penP*, *bla*<sub>TEM-16</sub>, and *bla*<sub>BKC-1</sub> genes.  
495 *PenP* gene encodes a narrow-spectrum  $\beta$ -lactamase that displays a more effective hydrolysis only of first  
496 - and second - generation penicillins and cephalosporins (84–86). The *bla*<sub>TEM-116</sub> gene has been reported  
497 in a variety of clinical isolates (68, 87). Studies have related that TEM-116  $\beta$ -lactamase can confer  
498 resistance to ceftazidime, cefotaxime, and aztreonam (88, 89). The *bla*<sub>BKC-1</sub> gene encodes a Brazilian  
499 *Klebsiella* carbapenemase (BKC-1) that can confer resistance to penicillins, broad-spectrum  
500 cephalosporins, aztreonam, and decreased susceptibility to carbapenems (90). Interestingly, BKC-1 was  
501 described for the first time in Brazil in three *K. pneumoniae* strains (91), and more recently in a *Citrobacter*  
502 *freundii* (92). Therefore, further show the *bla*<sub>BKC-1</sub> gene is spreading to other pathogens.

503 The strain *B. brasiliensis* sp. nov also carried *strA*, *strB*, *aac*(6′)-Ib, *aac*(6′)-II genes, which mediate  
504 resistance to aminoglycosides. *StrA* and *strB* form a tandem gene pair which encode aminoglycoside-3′-  
505 phosphotransferase and aminoglycoside-6-phosphotransferase, that confer resistance to many  
506 aminoglycoside antibiotics (93, 94). This gene pair can be found worldwide among diverse Gram-negative  
507 bacteria (95, 96). The *aac*(6′)-Ib gene is widely distributed among Gram-negative isolates, including  
508 *Brevundimonas diminuta* (71), and the main resistance mechanism to amikacin and other aminoglycosides  
509 is acetylation by the aminoglycoside 6′-N-acetyltransferase type Ib (*aac*(6′)-Ib) (97, 98).

510 Colistin resistance in Gram-negative bacteria can be attributed to mutation in *PhoPQ*, *PmrAB*, *qseC*, and  
511 plasmid-borne genes, such as *mcr* and its variants (99–101). Our strain displayed amino acid alterations  
512 at the position 283 in *qseC* (Ile283Leu), and position 81 in *phoP* (Arg81Cis). Similar mutations have been  
513 reported by Pitt et al. (102) as conferring colistin resistance in *K. pneumoniae*.

514 Resistance to quinolones is frequently acquired by mutations in the quinolone resistance-determining  
515 regions (QRDRs) of the target genes, such as *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* (68, 103). Our strain displayed  
516 a double amino acid substitution in *GyrA*, serine to leucine at codon 83, and aspartic acid to histidine at  
517 87 (*GyrA*-S83L-D87H). Studies have reported that Ser83-Leu substitution in *GyrA* is usual, but an  
518 additional mutation in codon 87 is associated with higher levels of quinolone resistance than mutations at  
519 other codons within the QRDR (103, 104). Although the *GyrB* subunit is less commonly associated with



520 quinolone resistance (105), *B. brasilienses* sp. nov presented amino acid substitutions at the position 466  
521 in GyrB (Glu466-Leu). Similar findings had reported in quinolone resistant *B. diminuta* (72).

522 Antimicrobial resistance can also be acquired by altered expression of porins leading to decreased  
523 penetration of antibiotic within bacteria or increased efflux of antibiotics from the bacterial cell due to  
524 overexpression of efflux pump acting synergistically with the outer membrane mutation (106). The  
525 *OqxBgb* gene present in *Brevundimonas brasilienses* sp. nov. can encode proteins that are part of  
526 multidrug efflux pumps responsible for fluoroquinolones resistance (107, 108) The *acrA*-like, *acrB*-like,  
527 and *tolC*-like genes found in *B. brasilienses* sp. nov. encode a well-studied RND-based tripartite efflux  
528 pump (AcrAB-TolC) in *Escherichia coli*, which is able to export chloramphenicol, fluoroquinolone,  
529 tetracycline, rifampin, novobiocin, fusidic acid, nalidixic acid, and  $\beta$ -lactam antibiotics (109–111).  
530 *Brevundimonas brasilienses* sp. nov. also carried *OprM* and *MexL* genes. *OprM* is the outer membrane  
531 component present in *Burkholderia vietnamiensis* and *Pseudomonas aeruginosa* (112, 113). This outer  
532 membrane protein is a component of MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexJK-OprM, and MexVW-OprM  
533 efflux systems, and it mediates multidrug resistance in *P. aeruginosa* (114, 115). Although *MexAB*,  
534 *MexXY*, *MexJK*, and *MexVW* genes were not found in our strain, the *MexL* encoded a TetR family  
535 repressor (*MexL*) that is a negative regulator of *MexJK* expression that can be associated to tetracycline  
536 and erythromycin resistance (116–118).

537 Additionally, we found genes that can encode resistance toward macrolides tetracyclines (*tetA*) (119)  
538 glycopeptide (*vanY*) (120), trimethoprim (*dfrA21*) (121), florfenicol (*floR*) (122), sulfonamides (*sul1*)  
539 (123), and cationic antimicrobial peptides such as daptomycin (*mprF*) (124). Nonetheless, antimicrobial  
540 susceptibility testing was not performed since these antibiotics are not a common option for treating  
541 *Brevundimonas* spp. infections (10).

542 In *Brevundimonas* species, little is known about virulence factors contributing to pathogenicity. In our  
543 study, *B. brasilienses* sp. nov. possessed an array of genes encoding virulence factors previously identified  
544 in many bacteria, and which are directly or indirectly related to biofilm formation (*carB*, (125); *ricA*,  
545 (126); *msrAB*, (11); *clpP*, (127, 128)), adhesion (*cheB*, (127); *bpsC*, (129)), invasion (*fliP* and *fliI*;  
546 Cornelis, 2006; *virB11*, (130)), LPS/O-antigen synthesis (*gmd*, (131)), synthesis of siderophore (*dhbA*  
547 and *dhbE*, (132)), and secretion and transport (*gspG*, (133), *xcpR*, (134)). Our strain also carried genes  
548 that encode isocitrate lyase (*icl*), elongation factor Tu (*tufA*), 2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate  
549 aldolase (*kdsA*), and heat shock protein (*htpB*). Huang et al., (19) reported similar results regarding the  
550 occurrence of these virulence-associated genes in *Brevundimonas* spp..

551 Mobile Genetic Elements (MGEs) play an important role in the dissemination of antibiotic resistance and  
552 emergence of MDR pathogens worldwide (135). Still, the distribution of mobile genetic elements in the  
553 *Brevundimonas* genus remains scarce. In our study, whole-genome assemblies of *B. brasilienses* sp. nov.

554 presented several MGEs that can be associated with antibiotic resistance and/or virulence, including  
 555 transposons, insertions, putative ICE with T4SS, and putative IME. Antibiotics genes cassettes (*strA*,  
 556 *strB*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-II*, *sul1*, *dfrA21*), IS6100, and Tn6001 were located closely at the scaffold 38.  
 557 IS6100 plays a role in *strA* and *strB* expression in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (136) and  
 558 have been identified in many bacteria (137). Although the *bla<sub>VIM-3</sub>* gene was not found in our isolate,  
 559 studies have show that Tn6001 can contains a *bla<sub>VIM-3</sub>*-harboring integron In450 and is associated to the  
 560 dissemination of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* and extensively drug-resistant *P.*  
 561 *aeruginosa* (138, 139). Bouallègue-Godet et al. (140) showed that *dfrA21*, which encodes resistance to  
 562 trimethoprim, may be located in plasmids and inserted as a single resistance cassette in a class I integron  
 563 of *Salmonella enterica*. The *aac(6')-Ib* gene, responsible for most amikacin-resistant strains, is usually  
 564 found in integrons, transposons, plasmids, and chromosomes of different bacterial species (141–143).  
 565 *Brevundimonas brasilienses* sp. nov. also presented ISKpn23 and putative ICE with T4SS harboring  
 566 resistance genes (*bla<sub>BKC-1</sub>* and *flor*) and virulence genes (*tufA* and/or *virB11*). Studies have shown that  
 567 ISKpn23 plays an important role in expression of *bla<sub>BKC-1</sub>* of *K. pneumoniae* (91, 144). The *flor* gene has  
 568 been described for the small plasmid p1807 (145) of *Glaesserella parasuis*, and on multi-drug resistance  
 569 region of an incomplete Tn4371-like integrative and conjugative element (ICE) in the *P. aeruginosa*  
 570 chromosome (146). The *virB11* virulence gene in our strain was associated with IME and puntative ICE  
 571 with T4SS. *Campylobacter jejuni* carries *virB11* gene localized on the pVir plasmid, that encodes various  
 572 genes that are homologous to a type IV secretion system (130, 147). In our study, plasmid sequences were  
 573 not detected using WGS, so it is uncertain whether many virulence and resistance genes are localized on  
 574 plasmids. Furthermore, we could not correlate all the detected antibiotic resistance or virulence genes to  
 575 MGEs due to the lack of literature.

576 In conclusion, we characterized a novel species of *Brevundimonas*, which is capable of infecting patients  
 577 admitted to neonatal intensive care units. Since cases of *Brevundimonas* infection are being reported with  
 578 increasing frequency, our report provides valuable information on this novel species that may be useful  
 579 for surveillance, particularly in healthcare settings.

## 581 References

- 582 1. SEGERS P, VANCANNEYT M, POT B, TORCK U, HOSTE B, DEWETTINCK D, FALSEN E,  
 583 KERSTERS K, de VOS P. 1994. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and  
 584 *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as  
 585 *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., Respectively. Int J  
 586 Syst Bacteriol 44:499–510.
- 587 2. Penna VTC, Martins SAM, Mazzola PG. 2002. Identification of bacteria in drinking and purified  
 588 water during the monitoring of a typical water purification system. BMC Public Health 2:13.

- 589 3. Tsubouchi T, Shimane Y, Usui K, Shimamura S, Mori K, Hiraki T, Tame A, Uematsu K, Maruyama  
590 T, Hatada Y. 2013. *Brevundimonas abyssalis* sp. nov., a dimorphic prosthecate bacterium isolated from  
591 deep-subsea floor sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:1987–1994.
- 592 4. Tsubouchi T, Koyama S, Mori K, Shimane Y, Usui K, Tokuda M, Tame A, Uematsu K, Maruyama  
593 T, Hatada Y. 2014. *Brevundimonas denitrificans* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from deep  
594 subseafloor sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:3709–3716.
- 595 5. Choi J-H, Kim M-S, Roh SW, Bae J-W. 2010. *Brevundimonas basaltis* sp. nov., isolated from black  
596 sand. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1488–1492.
- 597 6. Wang J, Zhang J, Ding K, Xin Y, Pang H. 2012. *Brevundimonas viscosa* sp. nov., isolated from saline  
598 soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:2475–2479.
- 599 7. Kang S-J, Choi N-S, Choi JH, Lee J-S, Yoon J-H, Song JJ. 2009. *Brevundimonas naejangsanensis* sp.  
600 nov., a proteolytic bacterium isolated from soil, and reclassification of *Mycoplana bullata* into the genus  
601 *Brevundimonas* as *Brevundimonas bullata* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:3155–3160.
- 602 8. Lee MR, Huang YT, Liao CH, Chuang TY, Lin CK, Lee SW, Lai CC, Yu CJ, Hsueh PR. 2011.  
603 Bacteremia caused by *Brevundimonas* species at a tertiary care hospital in Taiwan, 2000–2010.  
604 *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 30:1185–1191.
- 605 9. Chi C, Fung C, Wong W, Liu C. 2004. *Brevundimonas* bacteremia: Two case reports and literature  
606 review. *Scand J Infect Dis* 36:59–61.
- 607 10. Ryan MP, Pembroke JT. 2018. *Brevundimonas* spp: Emerging global opportunistic pathogens.  
608 *Virulence* 9:480–493.
- 609 11. Singh S, Bhatia BD, Ansary A, Gambhir P, Anand MR, Parakh M, Agarwal S, Roy MP, Walsh K,  
610 John TJ, Pothapregada S. 2015. *Brevundimonas* Septicemia: A Rare Infection with Rare Presentation.  
611 *Indian Pediatr*. *Indian Pediatr* 52:901–907.
- 612 12. Donofrio RS, Bestervelt LL, Saha R, Bagley ST. 2010. Quantitative real-time PCR and fluorescence  
613 in situ hybridization approaches for enumerating *Brevundimonas diminuta* in drinking water. *J Ind*  
614 *Microbiol Biotechnol* 37:909–918.
- 615 13. Estrela AB, Abraham W-R. 2010. *Brevundimonas vancanneytii* sp. nov., isolated from blood of a  
616 patient with endocarditis. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2129–2134.
- 617 14. Yang M-L, Chen Y-H, Chen T-C, Lin W-R, Lin C-Y, Lu P-L. 2006. Case report: Infective  
618 endocarditis caused by *Brevundimonas vesicularis*. *BMC Infect Dis* 6:179.
- 619 15. Mondello P, Ferrari L, Carnevale G. 2006. Nosocomial *Brevundimonas vesicularis* meningitis. *Infez*  
620 *Med* 14:235–7.
- 621 16. Pandit RT. 2012. *Brevundimonas Diminuta* Keratitis. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical*  
622 *Practice* 38:63–65.
- 623 17. Gupta P, Appannanavar S, Kaur H, Gupta V, Mohan B, Taneja N. 2014. Hospital acquired urinary  
624 tract infection by multidrug-resistant *Brevundimonas vesicularis*. *Indian J Pathol Microbiol* 57:486.
- 625 18. Shobha KL, Ramachandra L, Gowrish S, Nagalakshmi N. 2013. *Brevundimonas diminuta* causing  
626 urinary tract infection. *Webmedcentral* 4.
- 627 19. Huang Z, Yu K, Xiao Y, Wang Y, Xiao D, Wang D. 2022. Comparative Genomic Analysis Reveals  
628 Potential Pathogenicity and Slow-Growth Characteristics of Genus *Brevundimonas* and Description of  
629 *Brevundimonas pishanensis* sp. nov. *Microbiol Spectr* 10.
- 630 20. Liu L, Feng Y, Wei L, Zong Z. 2021. Genome-Based Taxonomy of *Brevundimonas* with Reporting  
631 *Brevundimonas huaxiensis* sp. nov. *Microbiol Spectr* 9:e0011121.
- 632 21. Revez J, Espinosa L, Albiger B, Leitmeyer KC, Struelens MJ. 2017. Survey on the Use of Whole-  
633 Genome Sequencing for Infectious Diseases Surveillance: Rapid Expansion of European National  
634 Capacities, 2015–2016. *Front Public Health* 5.
- 635 22. Jeong JH, Kweon OJ, Kim HR, Kim T-H, Ha S, Lee M-K. 2021. A Novel Species of the Genus  
636 *Arsenicococcus* Isolated From Human Blood Using Whole-Genome Sequencing. *Ann Lab Med* 41:323–  
637 327.

- 638 23. Wambui J, Cernela N, Stevens MJA, Stephan R. 2021. Whole Genome Sequence-Based  
639 Identification of *Clostridium estertheticum* Complex Strains Supports the Need for Taxonomic  
640 Reclassification Within the Species *Clostridium estertheticum*. *Front Microbiol* 12.
- 641 24. Hu S, Li K, Zhang Y, Wang Y, Fu L, Xiao Y, Tang X, Gao J. 2022. New Insights Into the Threshold  
642 Values of Multi-Locus Sequence Analysis, Average Nucleotide Identity and Digital DNA–DNA  
643 Hybridization in Delineating *Streptomyces* Species. *Front Microbiol* 13.
- 644 25. Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. 2021. Performance Standards for Antimicrobial  
645 Susceptibility Testing, 32<sup>nd</sup> ed. Available online at:  
646 <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>. Retrieved 19 September 2022.
- 647 26. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E,  
648 Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A,  
649 Vatopoulos A, Cantón R. 2010. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens:  
650 detection and surveillance issues. *Clinical Microbiology and Infection* 16:112–122.
- 651 27. Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global Spread of Carbapenemase-producing  
652 *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 17:1791–1798.
- 653 28. Ferreira RL, Rezende GS, Damas MSF, Oliveira-Silva M, Pitondo-Silva A, Brito MCA, Leonardecz  
654 E, Góes FR de, Campanini EB, Malavazi I, da Cunha AF, Pranchevicius M-C da S. 2020.  
655 Characterization of KPC-Producing *Serratia marcescens* in an Intensive Care Unit of a Brazilian  
656 Tertiary Hospital. *Front Microbiol* 11.
- 657 29. Ferreira RL, da Silva BCM, Rezende GS, Nakamura-Silva R, Pitondo-Silva A, Campanini EB, Brito  
658 MCA, da Silva EML, Freire CC de M, Cunha AF da, Pranchevicius M-C da S. 2019. High Prevalence  
659 of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Harboring Several Virulence and  $\beta$ -Lactamase Encoding  
660 Genes in a Brazilian Intensive Care Unit. *Front Microbiol* 9.
- 661 30. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler  
662 JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A,  
663 Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant  
664 bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance.  
665 *Clinical Microbiology and Infection* 18:268–281.
- 666 31. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI,  
667 Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin A v., Sirotkin A v., Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA.  
668 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing.  
669 *Journal of Computational Biology* 19:455–477.
- 670 32. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome  
671 assemblies. *Bioinformatics* 29:1072–1075.
- 672 33. Antipov D, Hartwick N, Shen M, Raiko M, Lapidus A, Pevzner PA. 2016. plasmidSPAdes:  
673 assembling plasmids from whole genome sequencing data. *Bioinformatics* btw493.
- 674 34. Grant JR, Stothard P. 2008. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes.  
675 *Nucleic Acids Res* 36:W181–W184.
- 676 35. Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068–2069.
- 677 36. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM,  
678 Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian  
679 T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The  
680 RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75.
- 681 37. Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva E v., Zdobnov EM. 2015. BUSCO: assessing  
682 genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31:3210–  
683 3212.
- 684 38. Cantalapiedra CP, Hernández-Plaza A, Letunic I, Bork P, Huerta-Cepas J. 2021. eggNOG-mapper  
685 v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale.  
686 *Mol Biol Evol* 38:5825–5829.

- 687 39. Conesa A, Götz S. 2008. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant  
688 genomics. *Int J Plant Genomics* 2008:619832.
- 689 40. Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7:  
690 Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol* 30:772–780.
- 691 41. Guindon S, Delsuc F, Dufayard J-F, Gascuel O. 2009. Estimating Maximum Likelihood Phylogenies  
692 with PhyML, p. 113–137. *In* .
- 693 42. Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol* 25:1253–1256.
- 694 43. Yoon S-H, Ha S-M, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. 2017. Introducing EzBioCloud: a  
695 taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst*  
696 *Evol Microbiol* 67:1613–1617.
- 697 44. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Göker M. 2013. Genome sequence-based species  
698 delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14:60.
- 699 45. Meier-Kolthoff JP, Carbasse JS, Peinado-Olarte RL, Göker M. 2022. TYGS and LPSN: a database  
700 tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic*  
701 *Acids Res* 50:D801–D807.
- 702 46. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, Fookes M, Falush D, Keane  
703 JA, Parkhill J. 2015. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 31:3691–  
704 3693.
- 705 47. Xu L, Dong Z, Fang L, Luo Y, Wei Z, Guo H, Zhang G, Gu YQ, Coleman-Derr D, Xia Q, Wang  
706 Y. 2019. OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous  
707 clusters across multiple species. *Nucleic Acids Res* 47:W52–W58.
- 708 48. Chaudhari NM, Gupta VK, Dutta C. 2016. BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. *Sci*  
709 *Rep* 6:24373.
- 710 49. Kanehisa M. 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 28:27–  
711 30.
- 712 50. Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo P, Tsang KK, Lago BA, Dave BM, Pereira S,  
713 Sharma AN, Doshi S, Courtot M, Lo R, Williams LE, Frye JG, Elsayegh T, Sardar D, Westman EL,  
714 Pawlowski AC, Johnson TA, Brinkman FSL, Wright GD, McArthur AG. 2017. CARD 2017: expansion  
715 and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*  
716 45:D566–D573.
- 717 51. Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, Rolain J-M. 2014.  
718 ARG-ANNOT, a New Bioinformatic Tool To Discover Antibiotic Resistance Genes in Bacterial  
719 Genomes. *Antimicrob Agents Chemother* 58:212–220.
- 720 52. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, Philippon A, Allesoe RL,  
721 Rebelo AR, Florensa AF, Fagelhauer L, Chakraborty T, Neumann B, Werner G, Bender JK, Stingl K,  
722 Nguyen M, Coppens J, Xavier BB, Malhotra-Kumar S, Westh H, Pinholt M, Anjum MF, Duggett NA,  
723 Kempf I, Nykäsenoja S, Olkkola S, Wiczorek K, Amaro A, Clemente L, Mossong J, Losch S,  
724 Ragimbeau C, Lund O, Aarestrup FM. 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from  
725 genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 75:3491–3500.
- 726 53. Hua X, Liang Q, Deng M, He J, Wang M, Hong W, Wu J, Lu B, Leptihn S, Yu Y, Chen H. 2021.  
727 BacAnt: A Combination Annotation Server for Bacterial DNA Sequences to Identify Antibiotic  
728 Resistance Genes, Integrons, and Transposable Elements. *Front Microbiol* 12.
- 729 54. Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, Frye JG, Haendiges J, Haft DH, Hoffmann M,  
730 Pettengill JB, Prasad AB, Tillman GE, Tyson GH, Klimke W. 2021. AMRFinderPlus and the Reference  
731 Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress  
732 response, and virulence. *Sci Rep* 11:12728.
- 733 55. Giles JA, Falconio J, Yuenger JD, Zenilman JM, Dan M, Bash MC. 2004. Quinolone Resistance–  
734 Determining Region Mutations and *por* Type of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates: Resistance  
735 Surveillance and Typing by Molecular Methodologies. *J Infect Dis* 189:2085–2093.

- 736 56. Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, Jin Q. 2016. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big  
737 data analysis—10 years on. *Nucleic Acids Res* 44:D694–D697.
- 738 57. Ross K, Varani AM, Snesrud E, Huang H, Alvarenga DO, Zhang J, Wu C, McGann P, Chandler M.  
739 2021. TnCentral: a Prokaryotic Transposable Element Database and Web Portal for Transposon  
740 Analysis. *mBio* 12.
- 741 58. Siguier P. 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res*  
742 34:D32–D36.
- 743 59. Bi D, Xu Z, Harrison EM, Tai C, Wei Y, He X, Jia S, Deng Z, Rajakumar K, Ou H-Y. 2012.  
744 ICEberg: a web-based resource for integrative and conjugative elements found in Bacteria. *Nucleic*  
745 *Acids Res* 40:D621–D626.
- 746 60. Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. 2011. PFAST: A Fast Phage Search Tool.  
747 *Nucleic Acids Res* 39:W347–W352.
- 748 61. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. 2007. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly  
749 interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 35:W52–W57.
- 750 62. Lee M, Srinivasan S, Kim MK. 2010. New taxa in Alphaproteobacteria: *Brevundimonas olei* sp.  
751 nov., an esterase-producing bacterium. *The Journal of Microbiology* 48:616–622.
- 752 63. Lefort V, Desper R, Gascuel O. 2015. FastME 2.0: A Comprehensive, Accurate, and Fast Distance-  
753 Based Phylogeny Inference Program: Table 1. *Mol Biol Evol* 32:2798–2800.
- 754 64. Farris JS. 1972. Estimating Phylogenetic Trees from Distance Matrices. *Am Nat* 106:645–667.
- 755 65. Flannery DD, Chiotos K, Gerber JS, Puopolo KM. 2022. Neonatal multidrug-resistant gram-  
756 negative infection: epidemiology, mechanisms of resistance, and management. *Pediatr Res* 91:380–391.
- 757 66. Lupande-Mwenebitu D, Tshiyongo RK, Lunguya-Metila O, Lavigne J-P, Rolain J-M, Diene SM.  
758 2021. First Isolation and Clinical Case of *Brevundimonas diminuta* in a Newborn with Low Birth  
759 Weight, in Democratic Republic of Congo: A Case Report. *Medicina (B Aires)* 57:1227.
- 760 67. Karadag N, Karagol BS, Kundak AA, Dursun A, Okumus N, Tanır G, Zenciroglu A. 2012.  
761 Spectrum of *Brevundimonas vesicularis* infections in neonatal period: a case series at a tertiary referral  
762 center. *Infection* 40:509–15.
- 763 68. Damas MSF, Ferreira RL, Campanini EB, Soares GG, Campos LC, Laprega PM, Soares da Costa A,  
764 Freire CC de M, Pitondo-Silva A, Cerdeira LT, Cunha AF da, Pranchevicius M-C da S. 2022. Whole  
765 genome sequencing of the multidrug-resistant *Chryseobacterium indologenes* isolated from a patient in  
766 Brazil. *Front Med (Lausanne)* 9.
- 767 69. Viswanathan R, Singh A, Mukherjee R, Sardar S, Dasgupta S, Mukherjee S. 2015. *Brevundimonas*  
768 *vesicularis*: A new pathogen in newborn. *J Pediatr Infect Dis* 05:189–191.
- 769 70. Pitout JDD, Church DL. 2004. Emerging gram-negative enteric infections. *Clin Lab Med* 24:605–  
770 626.
- 771 71. Almuzara MN, Barberis CM, Rodríguez CH, Famiglietti AMR, Ramirez MS, Vay CA. 2012. First  
772 Report of an Extensively Drug-Resistant VIM-2 Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Brevundimonas*  
773 *diminuta* Clinical Isolate. *J Clin Microbiol* 50:2830–2832.
- 774 72. Han XY, Andrade RA. 2005. *Brevundimonas diminuta* infections and its resistance to  
775 fluoroquinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55:853–859.
- 776 73. Chandra A, Das A, Sen M, Sharma M. 2017. *Brevundimonas diminuta* infection in a case of  
777 nephrotic syndrome. *Indian J Pathol Microbiol* 60:279.
- 778 74. Liang C-Y, Yang C-H, Lai C-H, Huang Y-H, Lin J-N. 2019. Genomic Features, Comparative  
779 Genomic Analysis, and Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Chryseobacterium arthrosphaerae* Strain  
780 ED882-96 Isolated in Taiwan. *Genes (Basel)* 10:309.
- 781 75. Hayashi Sant’Anna F, Bach E, Porto RZ, Guella F, Hayashi Sant’Anna E, Passaglia LMP. 2019.  
782 Genomic metrics made easy: what to do and where to go in the new era of bacterial taxonomy. *Crit Rev*  
783 *Microbiol* 45:182–200.
- 784 76. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for  
785 phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697–703.

- 786 77. Clarridge JE. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on  
787 clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17:840–62, table of contents.
- 788 78. Janda JM, Abbott SL. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the  
789 Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol* 45:2761–2764.
- 790 79. Dai H, Lu B, Li Z, Huang Z, Cai H, Yu K, Wang D. 2020. Multilocus sequence analysis for the  
791 taxonomic updating and identification of the genus *Proteus* and reclassification of *Proteus* genospecies 5  
792 O'Hara et al. 2000, *Proteus cibarius* Hyun et al. 2016 as later heterotypic synonyms of *Proteus terrae*  
793 Behrendt et al. 2015. *BMC Microbiol* 20:152.
- 794 80. Liu Y, Lai Q, Shao Z. 2017. A Multilocus Sequence Analysis Scheme for Phylogeny of *Thioclava*  
795 Bacteria and Proposal of Two Novel Species. *Front Microbiol* 8.
- 796 81. Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse H-J, Ludwig W, Kämpfer P. 2010. Notes on the  
797 characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:249–266.
- 798 82. Gillis M, Vandamme P, Vos P de, Swings J, Kersters K. 2015. Polyphasic Taxonomy, p. 1–10. *In*  
799 *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley.
- 800 83. Costa SS, Guimarães LC, Silva A, Soares SC, Baraúna RA. 2020. First Steps in the Analysis of  
801 Prokaryotic Pan-Genomes. *Bioinform Biol Insights* 14:117793222093806.
- 802 84. Pan X, He Y, Lei J, Huang X, Zhao Y. 2017. Crystallographic Snapshots of Class A  $\beta$ -Lactamase  
803 Catalysis Reveal Structural Changes That Facilitate  $\beta$ -Lactam Hydrolysis. *Journal of Biological*  
804 *Chemistry* 292:4022–4033.
- 805 85. Pan X, He Y, Chen T, Chan K-F, Zhao Y. 2017. Modified Penicillin Molecule with Carbapenem-  
806 Like Stereochemistry Specifically Inhibits Class C  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
- 807 86. Wong W-T, Chan K-C, So P-K, Yap H-K, Chung W-H, Leung Y-C, Wong K-Y, Zhao Y. 2011.  
808 Increased Structural Flexibility at the Active Site of a Fluorophore-conjugated  $\beta$ -Lactamase  
809 Distinctively Impacts Its Binding toward Diverse Cephalosporin Antibiotics. *Journal of Biological*  
810 *Chemistry* 286:31771–31780.
- 811 87. Jacoby GA, Bush K. 2016. The Curious Case of TEM-116. *Antimicrob Agents Chemother* 60:7000–  
812 7000.
- 813 88. Jeong SH, Bae IK, Lee JH, Sohn SG, Kang GH, Jeon GJ, Kim YH, Jeong BC, Lee SH. 2004.  
814 Molecular Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Produced by Clinical Isolates of  
815 *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean Nationwide Survey. *J Clin Microbiol*  
816 42:2902–2906.
- 817 89. Lahlaoui H, Dahmen S, Moussa M, Omrane B. 2011. First detection of TEM-116 extended-  
818 spectrum  $\beta$ -lactamase in a *Providencia stuartii* isolate from a Tunisian hospital. *Indian J Med Microbiol*  
819 29:258–261.
- 820 90. Bonnin RA, Jousset AB, Emeraud C, Oueslati S, Dortet L, Naas T. 2021. Genetic Diversity,  
821 Biochemical Properties, and Detection Methods of Minor Carbapenemases in Enterobacterales. *Front*  
822 *Med (Lausanne)* 7.
- 823 91. Nicoletti AG, Marcondes MFM, Martins WMBS, Almeida LGP, Nicolás MF, Vasconcelos ATR,  
824 Oliveira V, Gales AC. 2015. Characterization of BKC-1 Class A Carbapenemase from *Klebsiella*  
825 *pneumoniae* Clinical Isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 59:5159–5164.
- 826 92. Martins WMBS, Seco BMS, Sampaio JLM, Sands K, Toleman MA, Gales AC. 2020. Detection of  
827 BKC-1 in *Citrobacter freundii*: A clue to mobilisation in an IncQ1 plasmid carrying blaBKC-1. *Int J*  
828 *Antimicrob Agents* 56:106042.
- 829 93. Lee YS, Kim GH, Koh YJ, Jung JS. 2021. Identification of strA-strB Genes in Streptomycin-  
830 Resistant *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Biovar 2 Strains Isolated in Korea. *Plant Pathol J*  
831 37:489–493.
- 832 94. Sundin GW, Wang N. 2018. Antibiotic Resistance in Plant-Pathogenic Bacteria. *Annu Rev*  
833 *Phytopathol* 56:161–180.

- 834 95. Tancos KA, Villani S, Kuehne S, Borejsza-Wysocka E, Breth D, Carol J, Aldwinckle HS, Cox KD.  
835 2016. Prevalence of Streptomycin-Resistant *Erwinia amylovora* in New York Apple Orchards. *Plant Dis*  
836 100:802–809.
- 837 96. Petrova MA, Gorlenko ZM, Soina VS, Mindlin SZ. 2008. Association of the *strA-strB* genes with  
838 plasmids and transposons in the present-day bacteria and in bacterial strains from permafrost. *Genetika*  
839 44:1281–6.
- 840 97. Magallon J, Chiem K, Tran T, Ramirez MS, Jimenez V, Tolmasky ME. 2019. Restoration of  
841 susceptibility to amikacin by 8-hydroxyquinoline analogs complexed to zinc. *PLoS One* 14:e0217602.
- 842 98. Ramirez M, Tolmasky M. 2017. Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition.  
843 *Molecules* 22:2267.
- 844 99. Nirwan PK, Chatterjee N, Panwar R, Dudeja M, Jaggi N. 2021. Mutations in two component system  
845 (*PhoPQ* and *PmrAB*) in colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* from North Indian tertiary care  
846 hospital. *J Antibiot (Tokyo)* 74:450–457.
- 847 100. Breland EJ, Zhang EW, Bermudez T, Martinez CR, Hadjifrangiskou M. 2017. The Histidine  
848 Residue of *QseC* Is Required for Canonical Signaling between *QseB* and *PmrB* in Uropathogenic  
849 *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 199.
- 850 101. Pitt ME, Elliott AG, Cao MD, Ganesamoorthy D, Karaiskos I, Giamarellou H, Abboud CS,  
851 Blaskovich MAT, Cooper MA, Coin LJM. 2018. Multifactorial chromosomal variants regulate  
852 polymyxin resistance in extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Genom* 4.
- 853 102. Pitt ME, Cao MD, Butler MS, Ramu S, Ganesamoorthy D, Blaskovich MAT, Coin LJM, Cooper  
854 MA. 2019. Octapeptin C4 and polymyxin resistance occur via distinct pathways in an epidemic XDR  
855 *Klebsiella pneumoniae* ST258 isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74:582–593.
- 856 103. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia*  
857 *coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 25:358–373.
- 858 104. Minarini LAR, Darini ALC. 2012. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of  
859 *gyrA* and *parC* in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. *Braz J Microbiol* 43:1309–14.
- 860 105. Momen G, Aainouss A, Lamaammal A, Chettioui F, Blaghen M, Messoudi M, Belghmi K,  
861 Mouslim J, el Mzibri M, el Messaoudi MD, Khyatti M, Chaoui I. 2021. Molecular characterization of  
862 mutations associated with resistance to second line drugs in *Mycobacterium tuberculosis* patients from  
863 Casablanca, Morocco. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 63.
- 864 106. Rushdy AA, Mabrouk MI, Abu-Sef FA-H, Kheiralla ZH, -All SMA, Saleh NM. 2013. Contribution  
865 of different mechanisms to the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Salmonella enterica*.  
866 *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 17:431–437.
- 867 107. Salam LB. 2020. Unravelling the antibiotic and heavy metal resistome of a chronically polluted  
868 soil. *3 Biotech* 10:238.
- 869 108. Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Périchon B. 2010. Overexpression of Resistance-  
870 Nodulation-Cell Division Pump *AdeFGH* Confers Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*.  
871 *Antimicrob Agents Chemother* 54:4389–4393.
- 872 109. Piddock LJ v. 2006. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*  
873 4:629–636.
- 874 110. Fernandes P. 2003. Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with  
875 antibiotics. *Int J Antimicrob Agents* 22:211–216.
- 876 111. Okusu H, Ma D, Nikaido H. 1996. *AcrAB* efflux pump plays a major role in the antibiotic  
877 resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (*Mar*) mutants. *J Bacteriol*  
878 178:306–308.
- 879 112. Shinoy M, Dennehy R, Coleman L, Carberry S, Schaffer K, Callaghan M, Doyle S, McClean S.  
880 2013. Immunoproteomic Analysis of Proteins Expressed by Two Related Pathogens, *Burkholderia*  
881 *multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*, during Human Infection. *PLoS One* 8:e80796.



- 882 113. Wong KKY, Brinkman FSL, Benz RS, Hancock REW. 2001. Evaluation of a Structural Model of  
883 *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Protein OprM, an Efflux Component Involved in Intrinsic  
884 Antibiotic Resistance. *J Bacteriol* 183:367–374.
- 885 114. Scoffone VC, Trespidi G, Barbieri G, Irudal S, Perrin E, Buroni S. 2021. Role of RND Efflux  
886 Pumps in Drug Resistance of Cystic Fibrosis Pathogens. *Antibiotics* 10:863.
- 887 115. Alcalde-Rico M, Olivares-Pacheco J, Alvarez-Ortega C, Cámara M, Martínez JL. 2018. Role of the  
888 Multidrug Resistance Efflux Pump MexCD-OprJ in the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing  
889 Response. *Front Microbiol* 9.
- 890 116. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. 2007. Modes and Modulations of  
891 Antibiotic Resistance Gene Expression. *Clin Microbiol Rev* 20:79–114.
- 892 117. Chuanchuen R, Narasaki CT, Schweizer HP. 2002. The MexJK Efflux Pump of *Pseudomonas*  
893 *aeruginosa* Requires OprM for Antibiotic Efflux but Not for Efflux of Triclosan. *J Bacteriol* 184:5036–  
894 5044.
- 895 118. Chuanchuen R, Gaynor JB, Karkhoff-Schweizer R, Schweizer HP. 2005. Molecular  
896 Characterization of MexL, the Transcriptional Repressor of the *mexJK* Multidrug Efflux Operon in  
897 *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1844–1851.
- 898 119. Jahantigh M, Samadi K, Dizaji RE, Salari S. 2020. Antimicrobial resistance and prevalence of  
899 tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from lesions of colibacillosis in broiler  
900 chickens in Sistan, Iran. *BMC Vet Res* 16:267.
- 901 120. Stogios PJ, Savchenko A. 2020. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Science*  
902 29:654–669.
- 903 121. Aworh MK, Kwaga JKP, Hendriksen RS, Okolocha EC, Thakur S. 2021. Genetic relatedness of  
904 multidrug resistant *Escherichia coli* isolated from humans, chickens and poultry environments.  
905 *Antimicrob Resist Infect Control* 10:58.
- 906 122. Lu J, Zhang J, Xu L, Liu Y, Li P, Zhu T, Cheng C, Lu S, Xu T, Yi H, Li K, Zhou W, Li P, Ni L,  
907 Bao Q. 2018. Spread of the florfenicol resistance floR gene among clinical *Klebsiella pneumoniae*  
908 isolates in China. *Antimicrob Resist Infect Control* 7:127.
- 909 123. Domínguez M, Miranda CD, Fuentes O, de la Fuente M, Godoy FA, Bello-Toledo H, González-  
910 Rocha G. 2019. Occurrence of Transferable Integrons and sul and dfr Genes Among Sulfonamide-  
911 and/or Trimethoprim-Resistant Bacteria Isolated From Chilean Salmonid Farms. *Front Microbiol* 10.
- 912 124. Lin L-C, Chang S-C, Ge M-C, Liu T-P, Lu J-J. 2018. Novel single-nucleotide variations associated  
913 with vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Infect Drug Resist*  
914 Volume 11:113–123.
- 915 125. Zhuo T, Rou W, Song X, Guo J, Fan X, Kamau GG, Zou H. 2015. Molecular study on the carAB  
916 operon reveals that carB gene is required for swimming and biofilm formation in *Xanthomonas citri*  
917 subsp. *citri*. *BMC Microbiol* 15:225.
- 918 126. Adusei-Danso F, Khaja FT, DeSantis M, Jeffrey PD, Dubnau E, Demeler B, Neiditch MB, Dubnau  
919 D. 2019. Structure-Function Studies of the *Bacillus subtilis* Ric Proteins Identify the Fe-S Cluster-  
920 Ligating Residues and Their Roles in Development and RNA Processing. *mBio* 10.
- 921 127. Huang L, Wang L, Lin X, Su Y, Qin Y, Kong W, Zhao L, Xu X, Yan Q. 2017. mcp , aer ,  
922 cheB, and cheV contribute to the regulation of *Vibrio alginolyticus* (ND-01) adhesion under gradients of  
923 environmental factors. *Microbiologyopen* 6:e00517.
- 924 128. Wang C, Li M, Dong D, Wang J, Ren J, Otto M, Gao Q. 2007. Role of ClpP in biofilm formation  
925 and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect* 9:1376–1383.
- 926 129. Diale MO, Kayitesi E, Serepa-Dlamini MH. 2021. Genome In Silico and In Vitro Analysis of the  
927 Probiotic Properties of a Bacterial Endophyte, *Bacillus Paranthracis* Strain MHSD3. *Front Genet* 12.
- 928 130. Bacon DJ, Alm RA, Burr DH, Hu L, Kopecko DJ, Ewing CP, Trust TJ, Guerry P. 2000.  
929 Involvement of a Plasmid in Virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun* 68:4384–4390.

- 930 131. Böhme K, Heroven AK, Lobedann S, Guo Y, Stolle A-S, Dersch P. 2021. The Small Protein  
931 YmoA Controls the Csr System and Adjusts Expression of Virulence-Relevant Traits of *Yersinia*  
932 *pseudotuberculosis*. *Front Microbiol* 12.
- 933 132. May JJ, Wendrich TM, Marahiel MA. 2001. The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the  
934 biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric  
935 ester bacillibactin. *J Biol Chem* 276:7209–17.
- 936 133. Krall LJ, Klein S, Boutin S, Wu CC, Sähr A, Stanifer ML, Boulant S, Heeg K, Nurjadi D,  
937 Hildebrand D. 2021. Invasiveness of *Escherichia coli* Is Associated with an IncFII Plasmid. *Pathogens*  
938 10:1645.
- 939 134. Saeb AT, David SK, Al-Brahim H. 2015. Correction to: “In Silico Detection of Virulence Gene  
940 Homologues in the Human Pathogen *Sphingomonas* Spp.” *Evolutionary Bioinformatics*  
941 11:EBO.S23536.
- 942 135. Nicolas E, Oger CA, Nguyen N, Lambin M, Draime A, Leterme SC, Chandler M, Hallet BFJ.  
943 2017. Unlocking Tn3-family transposase activity in vitro unveils an asymmetric pathway for transposome  
944 assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114.
- 945 136. Sundin GW, Bender CL. 1995. Expression of the *strA-strB* streptomycin resistance genes in  
946 *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* and characterization of IS6100 in *X. campestris*.  
947 *Appl Environ Microbiol* 61:2891–2897.
- 948 137. Varani A, He S, Siguier P, Ross K, Chandler M. 2021. The IS6 family, a clinically important group  
949 of insertion sequences including IS26. *Mob DNA* 12:11.
- 950 138. Tseng S-P, Tsai J-C, Teng L-J, Hsueh P-R. 2009. Dissemination of transposon Tn6001 in  
951 carbapenem-non-susceptible and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Taiwan. *Journal*  
952 *of Antimicrobial Chemotherapy* 64:1170–1174.
- 953 139. Tseng S-P, Hsueh P-R, Tsai J-C, Teng L-J. 2007. Tn 6001 , a Transposon-Like Element Containing  
954 the *bla*VIM-3 -Harboring Integron In450. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4187–4190.
- 955 140. Bouallègue-Godet O, Salem Y ben, Fabre L, Demartin M, Grimont PAD, Mzoughi R, Weill F-X.  
956 2005. Nosocomial Outbreak Caused by *Salmonella enterica* Serotype Livingstone Producing CTX-M-  
957 27 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase in a Neonatal Unit in Sousse, Tunisia. *J Clin Microbiol* 43:1037–  
958 1044.
- 959 141. Ramirez MS, Nikolaidis N, Tolmasky ME. 2013. Rise and dissemination of aminoglycoside  
960 resistance: the *aac*(6′)-Ib paradigm. *Front Microbiol* 4.
- 961 142. Ramirez MS, Tolmasky ME. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*  
962 13:151–171.
- 963 143. Reeves CM, Magallon J, Rocha K, Tran T, Phan K, Vu P, Yi Y, Oakley-Havens CL, Cedano J,  
964 Jimenez V, Ramirez MS, Tolmasky ME. 2020. Aminoglycoside 6′-N-acetyltransferase Type Ib  
965 [AAC(6′)-Ib]-Mediated Aminoglycoside Resistance: Phenotypic Conversion to Susceptibility by Silver  
966 Ions. *Antibiotics* 10:29.
- 967 144. Martins WMBS, Nascimento EA, Cayô R, Gales AC. 2022. Role of IS Kpn23 in *bla*BKC-1  
968 Expression and Mobilization. *Antimicrob Agents Chemother* 66.
- 969 145. Sun H, Zhang J, Miao Q, Zhai Y, Pan Y, Yuan L, Yan F, Wu H, Hu G. 2022. Genomic insight into  
970 the integrative conjugative elements from ICEHpa1 family. *Front Vet Sci* 9.
- 971 146. Qian C, Liu H, Cao J, Ji Y, Lu W, Lu J, Li A, Zhu X, Shen K, Xu H, Chen Q, Zhou W, Lu H, Lin  
972 H, Zhang X, Li Q, Lin X, Li K, Xu T, Zhu M, Bao Q, Zhang H. 2021. Identification of *floR* Variants  
973 Associated With a Novel Tn4371-Like Integrative and Conjugative Element in Clinical *Pseudomonas*  
974 *aeruginosa* Isolates. *Front Cell Infect Microbiol* 11.
- 975 147. Sierra-Arguello YM, Perdoncini G, Rodrigues LB, Ruschel dos Santos L, Apellanis Borges K,  
976 Quedi Furian T, Pippi Salle CT, de Souza Moraes HL, Pereira Gomes MJ, Pinheiro do Nascimento V.  
977 2021. Identification of pathogenic genes in *Campylobacter jejuni* isolated from broiler carcasses and  
978 broiler slaughterhouses. *Sci Rep* 11:4588.
- 979

## Legends (Figures and Tables)

**Figure 1.** (A) Genome statistics of *Brevundimonas* sp. (B) A circular representation of the chromosome of *Brevundimonas* sp. The outermost and the second circle show the coding sequence (CDS), transfer ribonucleic acid (tRNA), and ribosomal ribonucleic acid (rRNA). The third circle shows the GC content (black). The fourth circle demonstrates the GC skew curve (positive GC skew, green; negative GC skew, violet). Markings inside the innermost circle represent genome positions in Mbp. (C) Subsystem category distribution of major protein coding genes by the RAST annotation server. The bar chart shows the subsystem coverage in percentage, in which green bar corresponds to the percentage of proteins included. The pie chart shows the percentage distribution of the 27 subsystem categories. (D) COG classification in four main categories, metabolism (blue bars), information processing and storage (yellow), cellular processes and signaling (red bars), and unknown function (green bar).

**Figure 2.** A) Maximum-likelihood tree based on 16S rRNA gene sequences of strain *Brevundimonas* sp. and the members of the genus *Brevundimonas*. B) Phenotypic characteristics that differentiate strain *Brevundimonas* sp. of some related *Brevundimonas* species. *Brevundimonas* sp. (data from this study). *B. olei* MJ15<sup>T</sup>; *B. naejangsanensis* KCTC 22631<sup>T</sup>; *B. diminuta* KCTC 12488<sup>T</sup>; *B. vesicularis* KCTC 12421<sup>T</sup> (data were taken from (62)). Symbols: +, positive; -, negative; W, weak reaction; ND = no data available.

**Figure 3.** Comparative genomic analysis of *Brevundimonas* spp. (A) MLSA phylogenetic tree. (B) Heatmap with ANI results. (C) Heatmap with calculations referring to dDDH. (D) Phylogenomic tree based on TYGS results showing the relationship between *Brevundimonas* sp. strain with *Brevundimonas* reference sequence strains deposited at NCBI. Tree inferred with FastME 2.1.6.1 (63) from GBDP (BLAST genome distance phylogeny method) distances calculated from genomic sequences. Branch lengths are scaled in terms of the GBDP distance formula d5. The numbers above the branches are GBDP pseudo-bootstrap support values > 60 % of 100 replications, with an average branch support of 75.1 %. The tree was rooted at the midpoint (64).

**Figure 4.** Comparative genomic analysis. (A) Phylogenetic tree constructed using the core genome. (B) Phylogenetic tree constructed using the accessory genome. (C) KEGG pathway classification in core, accessory, and unique genomes in the four most closely related *Brevundimonas* (Clade 5). (D) Distribution of KEGG pathway classification. (E) Venn diagram and bar graph showing the numbers of unique and shared orthologous genes present in *Brevundimonas* ssp. (Clade 5). (F) Number of proteins, clusters, and singletons.

**Table 1.** Resistome of *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov.

(-) Susceptibility testing was not performed. \*Mutations in genes conferring resistance to quinolones (GyrA, S83L and D87H; GyrB, Leu-466) and colistin (PhoP, Arg81Cis and *qseC*, Ile283Leu).

**Table 2.** Virulence determinants in *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov.

**Figure 5.** Mobile Genetic Elements (MGEs) in *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov strain. **(A)** Genetic composition of the MGEs. **(B)** Schematic representation of MGEs identified in *B. brasiliensis* sp. nov. Black line represents the DNA strand, the blue line represents the ICEs. The red and light green triangles are the attLs and attRs, respectively. The light orange rectangles are the transposons, and the dark blue circles are the insertion sequences. The genes are represented by arrows, the dark green arrows are the genes referring to conjugation of the ICEs, the yellow arrows are virulence genes, and the purple arrows are resistance genes.

### Supplementary

**Figure S1.** (A) Amino acid sequence alignment for the GyrA QRDR (Ser83Leu) of *Brevundimonas brasiliensis* sp.nov; GyrB QRDR (Glu466Leu) of *Brevundimonas brasiliensis* sp.nov ; and mutations in QseC (Ser8Arg) of *Brevundimonas brasiliensis* sp.nov and QseC (Ile283Leu) *Brevundimonas brasiliensis* sp.nov ; PhoP (Arg81Cys) *Brevundimonas brasiliensis* sp.nov. (B) Known mutations in genes conferring resistance to quinolones (GyrA and GyrB QDDR) and colistin (*qseC* and *phoP*).

**Table S1.** Reference and complete genomes used in this manuscript, including accession number.

**Table S3.** *Brevundimonas* ssp. used in MLSA analysis along with its accession number and annotation type.

\* Reference genomes *Brevundimonas*

**Table S4.** *Brevundimonas* ssp. used in the ANI and dDDH calculation analysis with their respective accession numbers.

\* Reference genomes *Brevundimonas*

**Table S5.** Reference genomes used in TYGS analysis and their respective accession numbers.

**Table S6.** *Brevundimonas* genomes used in the core and accessory genome analysis.

\* Reference genomes *Brevundimonas*



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Xiaojiong Jia,  
Harvard Medical School, United StatesREVIEWED BY  
Polly Soo Xi Yap,  
Monash University Malaysia, Malaysia  
Joshy M. Easow,  
Sri Balaji Vidyapeeth University, India\*CORRESPONDENCE  
Maria-Cristina da Silva Pranchevicus  
mcspranc@gmail.com†These authors have contributed  
equally to this workSPECIALTY SECTION  
This article was submitted to  
Infectious Diseases – Surveillance,  
Prevention and Treatment,  
a section of the journal  
Frontiers in MedicineRECEIVED 05 June 2022  
ACCEPTED 30 June 2022  
PUBLISHED 28 July 2022CITATION  
Damas MSF, Ferreira RL, Campanini EB,  
Soares GG, Campos LC, Laprega PM,  
Soares-Costa A, Freire CCM,  
Pitondo-Silva A, Cerdaira LT, Cunha AF  
and Pranchevicus MCS (2022) Whole  
genome sequencing of the  
multidrug-resistant *Chryseobacterium*  
*indologenes* isolated from a patient  
in Brazil.  
*Front. Med.* 9:931379.  
doi: 10.3389/fmed.2022.931379COPYRIGHT  
© 2022 Damas, Ferreira, Campanini,  
Soares, Campos, Laprega, Soares da  
Costa, Freire, Pitondo-Silva, Cerdaira,  
Cunha and Pranchevicus. This is an  
open-access article distributed under  
the terms of the Creative Commons  
Attribution License (CC BY). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the  
original author(s) and the copyright  
owner(s) are credited and that the  
original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice. No use, distribution  
or reproduction is permitted which  
does not comply with these terms.

## Whole genome sequencing of the multidrug-resistant *Chryseobacterium indologenes* isolated from a patient in Brazil

Marcelo Silva Folhas Damas<sup>1†</sup>, Roumayne Lopes Ferreira<sup>1†</sup>,  
Emeline Boni Campanini<sup>1†</sup>, Gabriela Guerrero Soares<sup>1†</sup>,  
Leslie Camelo Campos<sup>2</sup>, Pedro Mendes Laprega<sup>3</sup>,  
Andrea Soares da Costa<sup>4</sup>, Caio César de Melo Freire<sup>4</sup>,  
André Pitondo-Silva<sup>5</sup>, Louise Teixeira Cerdeira<sup>4</sup>,  
Anderson Ferreira da Cunha<sup>1</sup> and  
Maria-Cristina da Silva Pranchevicus<sup>1,5\*</sup><sup>1</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil, <sup>2</sup>Laboratório Central de Saúde Pública do Tocantins, Palmas, TO, Brazil, <sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Odontologia e Tecnologia Ambiental, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brazil, <sup>4</sup>Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, United Kingdom, <sup>5</sup>Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Biodiversidade Tropical - BIOTROP, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil

*Chryseobacterium indologenes* is a non-glucose-fermenting Gram-negative bacillus. This emerging multidrug resistant opportunistic nosocomial pathogen can cause severe infections in neonates and immunocompromised patients. This study aimed to present the first detailed draft genome sequence of a multidrug-resistant *C. indologenes* strain isolated from the cerebrospinal fluid of an infant hospitalized at the Neonatal Intensive Care Unit of Brazilian Tertiary Hospital. We first analyzed the susceptibility of *C. indologenes* strain to different antibiotics using the VITEK 2 system. The strain demonstrated an outstanding resistance to all the antibiotic classes tested, including  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, glycolcycline, and polymyxin. Next, *C. indologenes* was whole-genome-sequenced, annotated using Prokka and Rapid Annotation using Subsystems Technology (RAST), and screened for orthologous groups (EggNOG), gene ontology (GO), resistance genes, virulence genes, and mobile genetic elements using different software tools. The draft genome contained one circular chromosome of 4,836,765 bp with 37.32% GC content. The genomic features of the chromosome present numerous genes related to cellular processes that are essential to bacteria. The MDR *C. indologenes* revealed the presence of genes that corresponded to the resistance phenotypes, including genes to  $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>IND-13</sub>, *bla*<sub>CIA-3</sub>, *bla*<sub>TEM-116</sub>, *bla*<sub>OXA-209</sub>, *bla*<sub>VEB-15</sub>), quinolone (*mcbG*), tigecycline (*tet(X6)*), and genes encoding efflux pumps which confer resistance to aminoglycosides (*RanA/RanB*), and colistin (*HlyD/ToIC*). Amino acid substitutions related to quinolone resistance were observed in