



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Instituto Biomédico
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Avaliação do perfil de virulência e resistência
antimicrobiana em *Aeromonas* spp. isoladas da cadeia
alimentar no Brasil**

Emily Moraes Roges

Orientadora: Dr^a. Dália dos Prazeres Rodrigues

Rio de Janeiro
2013

Emily Moraes Roges

**Avaliação do perfil de virulência e resistência
antimicrobiana em *Aeromonas* spp. isoladas da cadeia
alimentar no Brasil**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Dr^a. Dalia dos Prazeres Rodrigues

Rio de Janeiro
2013

Roges, Emily Moraes.

- Avaliação do perfil de virulência e resistência antimicrobiana em *Aeromonas* spp. isoladas da cadeia alimentar no Brasil / Emily Moraes Roges. -- Rio de Janeiro, 2013.

112f.: il

Dissertação (Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

1. *Aeromonas*. 2. Cadeia Alimentar. 3. Virulência. 4. Resistência

I. Título

Emily Moraes Roges

**Avaliação do perfil de virulência e resistência
antimicrobiana em *Aeromonas* spp. isoladas da cadeia
alimentar no Brasil**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Eduardo de Matos Nogueira (Doutor em Química Biológica) UFRJ

Dr. Salvatore Siciliano (Doutor em Ciências Biológicas) UFRJ

Prof^a. Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi (Doutora em Ciências) UFRJ

*Que Deus me permita falar
como eu quisera, e ter
pensamentos dignos dos dons
que recebi, porque é ele
mesmo quem guia a sabedoria
e emenda os sábios,
porque nós estamos nas suas
mãos, nós e nossos discursos,
toda a nossa inteligência e
nossa habilidade;
foi ele quem me deu a
verdadeira ciência de todas as
coisas, quem me fez conhecer
a constituição do mundo e as
virtudes dos elementos,
o começo, o fim e o meio dos
tempos, a sucessão dos
solstícios e as mutações das
estações,
os ciclos do ano e as posições
dos astros,
a natureza dos animais e os
instintos dos brutos, os poderes
dos espíritos e os pensamentos
dos homens, a variedade das
plantas e as propriedades das
raízes.*

*Tudo que está escondido e
tudo que está aparente eu
conheço: porque foi a
sabedoria, criadora de todas as
coisas, que mo ensinou.*

(Sabedoria 7, 15-22)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho
Aos meus amados pais Jô e
José
A minha querida irmã Evelyn
A minha doce afilhada Maria
A todos os meus amigos e
familiares por todo incentivo,
carinho e confiança.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me ama desde sempre. Que escolheu a minha missão e me dá forças para realizá-la. É Ele que me mantém de pé diante de toda tribulação e é n'Ele que está minha confiança. Diante d'Ele não há temor, seu Amor é infinito bem como a sua misericórdia. É suave e compassivo, nunca se esquece de seus filhos aos quais tanto ama. Obrigada Senhor. "Bendize a lahweh, ó minha alma, e tudo que há em mim ao teu nome santo!" (Sl 103, 1). O Seu Amor é o que me conduz e sua doce Misericórdia me sustenta.

A minha mãezinha do céu. Que me ama e me protege. Intercede por mim e roga a seu amado Filho que cuide de mim e esteja sempre comigo.

Aos meus pais que apoiaram minha decisão e que me deram suporte para seguir adiante. Que acreditaram em mim e no meu potencial. Que são exemplos de caráter e dedicação.

A minha irmã, por dizer todos os dias que eu sou o máximo e por torcer pela realização dos meus sonhos.

A minha família que compreendeu as minhas ausências e que me apoiou e incentivou a seguir meus sonhos e ideais.

Aos meus professores. Se hoje eu sei, é porque vocês se dedicaram de corpo, alma e coração para isso. O meu conhecimento reflete o seu carinho. Obrigada por saberem me corrigir e me incentivar, por me ensinarem valores que vão muito além dos livros.

A minha orientadora, que abriu as portas do laboratório para mim quando eu não sabia nada e me deu as ferramentas para estar onde estou agora. Uma pessoa que eu admiro por ser forte, dedicada e incansável. Alguém que, para o meu próprio bem, exigiu e exige muito de mim e com quem aprendi muito.

A toda a equipe do LRNEB. Todas essas pessoas fizeram parte do meu aprendizado, e cada um, a seu modo, me auxiliou a reunir a bagagem necessária para concretizar essa dissertação.

Aos meus amigos. Foi Deus, quem escolheu vocês para serem os melhores amigos que eu pudesse ter. Pessoas doces e amáveis que estiveram e

estão sempre ao meu lado, seja para sorrir, para chorar, para lutar, para cair, para triunfar... Enfim, para tudo.

Aos queridos Thais, Vinícius e Elaine, mais que amigos companheiros de aventuras! Pessoas essenciais na minha vida, que caminham comigo desde a faculdade. Meus biomedes favoritos! Obrigada por toda amizade e compreensão.

As queridas Roberta, Rafa e Stephanie por fazer os meus dias mais ensolarados e divertidos. Por que não basta ser amigo, tem que viver o lado B da vida!

A minha Comunidade Jovem Jerusalém por ser presença viva de Deus na minha vida. Por ser canal da graça de Deus a cada dia. Por todo incentivo e encorajamento.

Novamente, agradeço a Deus. Obrigada Senhor. Sem Ti não sou nada.

RESUMO

Aeromonas spp. são habitantes naturais de ambientes aquáticos, podendo estar associadas a numerosas infecções em humanos e animais, sendo *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* causa da maioria das infecções humanas. Sua patogênese é multifatorial, associada a uma grande variedade de fatores de virulência. No presente estudo foram selecionadas 120 cepas sendo 56 *A. caviae* e 64 *A. hydrophila* isoladas de 2008 a 2012. Na avaliação fenotípica identificamos as enzimas collagenase, elastase, hemolisina e DNase. O teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado pelo método de difusão em disco (CLSI 2011/12). A Reação em Cadeia da Polimerase foi realizada para a detecção de hemolisina (*hlyA/aerA*), enterotoxinas (*act/alt*) lipase (*lip/gcat*) e DNase. DNase foi observada em 97,5% isolados e hemólise em 75 cepas. As enterotoxinas foram positivas em 23 e 21 cepas, respectivamente. Os genes *lip*(43) e *gcat*(45) e as enzimas collagenase(16) e elastase(13) são produtos elaborados por *Aeromonas* que são capazes de degradar proteínas biológicas complexas presentes no tecido conjuntivo e de soro, incluindo fibrinogênio, albumina, elastina e colágeno. *A. caviae* foram isoladas a partir de fezes (13) e secreções (2). Entre estas, cinco foram suscetíveis a todos os antimicrobianos e apresentaram capacidade de produção de DNase e aerolisina (*aerA*). Entre as cepas de *A. hydrophila*, 11 eram de origem fecal e 5 de secreção, pele, sangue fluido, sinovial e do pulmão, sendo as demais de origem animal e ambiental. Foi observada a prevalência dos genes hemolisina *aerA* e *hlyA*, presente em quase todos os isolados. A cepa isolada a partir da pele se mostrou collagenase positiva, coerente com o papel atribuído a esta enzima na infecção de ferimentos. A distribuição dos diferentes perfis permitiu observar a prevalência dos perfis: *hlyA*, *dnase*, *gcat*, hem em 14 cepas; *aerA*, *dnase*, *lip*, *act*, *hem* em nove cepas e *aerA*, *hlyA*, *dnase*, *lip*, *act*, *hem* em oito cepas, todas de origem animal. Particularmente entre aquelas de origem humana, diferentes perfis foram observados. A totalidade das cepas apresentou sensibilidade a nitrofurantoina, e a distribuição da resistência para as demais drogas foi AMK 11,67%, NAL 12,5%, GEN 3,34%, SXT 7,5%, TCY 7,5%, CHL 1,67%, CAZ 2,5%, CIP 3,34%, IPM 2,5% e CTX 13,35%., incluindo 2 cepas de *A. hydrophila* de origem fecal que eram multi resistentes a AMK-NAL-GEN-TCY-CTX e AMK-NAL-GEN-SXT-TCY-CIP-CTX. Entre as cepas analisadas a presença de enzimas extracelulares, genes de virulência e crescente resistência antimicrobiana em *Aeromonas* são preditivos de sua relevância apontando inclusive a possibilidade de intercâmbio ambiental e mostrando sua capacidade de transferência gênica e relevância em saúde pública.

Palavras chave: *Aeromonas*, Virulência, Resistência antimicrobiana

ABSTRACT

Aeromonas spp. are natural inhabitants of aquatic environments and may be associated with numerous infections in humans and animals, *A. hydrophila*, and *A. caviae*. *A. veronii* cause of most human infections. Its pathogenesis is multifactorial, associated with a wide variety of virulence factors. The present study selected 120 strains being 56 *A. caviae* and 64 *A. hydrophila* isolated from 2008 to 2012. In phenotypic analysis identified the enzyme collagenase, elastase, hemolysin and DNase. The antimicrobial susceptibility testing was performed by disk diffusion method (CLSI 2011/12). The Polymerase Chain Reaction was performed for detection of hemolysin (*hlyA* / *aerA*), enterotoxin (*act* / *alt*) lipase (*lip* / *gcat*) and dnase. The dnase was observed in 97.5% isolated and hemolysis on 75 strains. The enterotoxins were positive in 23 and 21 strains, respectively. Genes *lip* (43) and *gcat* (45) and enzymes collagenase (16) and elastase (13) are produced by *Aeromonas* that are able to degrade proteins present in complex biological tissue and serum, including fibrinogen, albumin, elastin and collagen. *A. caviae* were isolated from faeces (13) and secretions (2). Among these, five were susceptible to all antimicrobials and had a production capacity of dnase and aerolysin (*aerA*). Among the strains of *A. hydrophila*, 11 were of fecal origin and 5 of secretion, skin, blood fluid, synovial and lung, and other animal and environmental. We observed the prevalence of haemolysin *aerA* and *hlyA* gene, present in nearly all isolates. The strain isolated from the skin, collagenase proved positive, consistent with the role assigned to this enzyme in the infection of wounds. The distribution of different profiles allowed to observe the prevalence of profiles: *hlyA*, dnase, *gcat*, hem in 14 strains; *aerA*, dnase, *lip*, *act*, hem in nine strains and *aerA*, *hlyA*, dnase, *lip*, *act*, hem in eight strains, all of animal origin. Particularly among those of human origin, different profiles were observed. All the strains showed sensitivity to nitrofurantoin, and distribution of resistance to other drugs AMK was 11.67%, 12.5% NAL, 3.34% GEN, SXT 7.5%, 7.5% TCY, CHL 1, 67%, 2.5% CAZ, CIP 3.34%, 2.5% and CTX IPM 13.35%. including *A. hydrophila* two strains of fecal origin that were resistant to multi-AMK-GEN-NAL TCY and AMK-CTX-NAL-SXT-GEN-TCY-CIP-CTX. Among the strains analyzed the presence of extracellular enzymes, virulence genes and increasing antimicrobial resistance in *Aeromonas* are predictive of their relevance pointing including the possibility of environmental exchange and showing their ability of gene transfer and relevance for public health.

Key words: *Aeromonas*, Virulence, Antimicrobial resistance

SUMÁRIO

Introdução	1
Revisão Bibliográfica	3
Taxonomia	3
Ecologia	6
Infecção	10
Infecções Intestinais	11
Infecções Extra-intestinais	13
Infecções de Feridas	14
Diagnóstico	15
Fatores de Virulência	17
Resistencia aos Antimicrobianos	21
Objetivos	23
Gerais	23
Específicos	23
Material e Métodos	24
Seleção de cepas	24
Caracterização bioquímica	24
Detecção dos fatores de virulência	28
Colagenase	28
Elastase	28
Condrítinase	28
Hemolisina	29
DNase	29
Determinação da Suscetibilidade aos Antimicrobianos	30
Caracterização dos genes de virulência	32

Caracterização dos genes de resistência aos antimicrobianos	34
Resultados	35
Discussão	56
Conclusões	67
Referencias Bibliográficas	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Diferenciação de <i>Aeromonas</i> spp. e <i>Vibrio</i> spp. (Adaptado de Janda; Abbott, 2010).	15
Quadro 2: Distribuição das cepas por ano.	24
Quadro 3: Drogas empregadas no TSA.	31
Quadro 4: Sequência dos iniciadores, condições de amplificação e tamanhos de produtos para os genes de virulência de <i>Aeromonas</i> sp.	33
Quadro 5: Iniciadores para pesquisa de genes relacionados ao perfil fenotípico de resistência antimicrobiana de <i>Aeromonas</i> sp.	34
Quadro 6: Comparação entre os perfis de virulência em <i>Aeromonas</i> spp. de origem humana e ambiental isoladas na região Nordeste do Brasil.	46
Quadro 7: Perfis de virulência em <i>Aeromonas</i> spp. de origem humana e ambiental isoladas na região Sul do Brasil.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fontes potenciais de colonização e infecção por <i>Aeromonas</i> spp. em humanos (adaptado de Janda; Abbott, 2010).	7
Figura 2: Fluxograma do isolamento e caracterização bioquímica de <i>Aeromonas</i> spp.	27
Figura 3: Caracterização do gene de virulência <i>hlyA</i> por PCR (597pb).	37
Figura 4: Caracterização do gene de virulência <i>aerA</i> por PCR (431pb).	38
Figura 5: Caracterização por PCR do Gene de Virulência <i>act</i> (232pb).	38
Figura 6: Caracterização por PCR do gene de virulência <i>alt</i> (442pb).	39
Figura 7: Caracterização por PCR do Gene de Virulência <i>exu</i> (323pb).	41
Figura 8: Caracterização por PCR do Gene de Virulência <i>ser</i> (350pb).	41
Figura 9: Caracterização por PCR do Gene de Virulência <i>lip</i> (247pb).	42
Figura 10: Caracterização por PCR do Gene de Virulência <i>gcat</i> (237pb).	42
Figura 11: Caracterização de <i>aac(6')-Ib-cr</i> em <i>Aeromonas hydrophila</i> (482pb).	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição das cepas de <i>Aeromonas</i> spp. de acordo com ano, espécie e origem.	35
Tabela 2: Distribuição dos fatores de virulência detectados em testes fenotípicos e genotípicos.	36
Tabela 3: Distribuição dos perfis associados à capacidade hemolítica em <i>Aeromonas</i> spp. de acordo com as diferentes fontes de isolamento.	37
Tabela 4: Perfis de virulência identificados em <i>Aeromonas</i> spp. de origem ambiental.	45
Tabela 5: Distribuição perfis de virulência observados em <i>Aeromonas caviae</i> a partir das diferentes fontes de isolamento.	48
Tabela 6: Perfis de virulência de <i>Aeromonas hydrophila</i> oriunda de diferentes fontes.	49
Tabela 7: Distribuição dos perfis de resistência em <i>Aeromonas hydrophila</i> por fonte de isolamento.	51
Tabela 8: Distribuição dos perfis de resistência em <i>Aeromonas caviae</i> por fonte de isolamento.	52
Tabela 9: Comparação entre os perfis de resistência antimicrobiana e virulência em <i>Aeromonas</i> spp. de variadas fontes.	55

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Prevalência dos genes *act* e *alt* detectados em *Aeromonas* sp. através da PCR nas diferentes fontes. 40
- Gráfico 2:** Distribuição dos perfis fenotípicos de virulência em *A. hydrophila* e *A. caviae*. 43
- Gráfico 3:** Frequência dos marcadores de virulência em *Aeromonas* spp. isolados de fonte humana de origem intestinal e extra intestinal. 44
- Gráfico 4:** Marcadores de virulência prevalentes em *Aeromonas* spp. isolados de mamíferos marinhos. 45
- Gráfico 5:** Distribuição da resistência antimicrobiana em *Aeromonas* spp. por região geográfica. 50
- Gráfico 6:** Resistência a diferentes classes de drogas nas regiões geográficas. 53
- Gráfico 7:** Percentuais de resistência às classes de drogas antimicrobianas por espécie nas diferentes regiões geográficas. 53

Lista de Abreviaturas

AB	Ambiente
ADH	Arginina dehidrolase
AMK	Amicacina
AN	Animal
APA	Agua Peptonada Alclina
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain-heart infusion
BrEt	Brometo de Etídeo
CAZ	Ceftazidime
CHL	Cloranfenicol
CIP	Ciprofloxacina
CO2	Gás carbônico
CTX	Ceftriaxona
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Agencia de Proteção Ambiental
FDA	Food and Drug Administration
GEN	Gentamicina
GSP	Glutamate Starch Phenol Red agar
HG	Grupos de Hibridização
HU	Humana
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
KIA	Kligler Iron Agar

KOH	Hidróxido de potássio
LDC	Lisina descarboxilase
LIA	Lisina Iron Agar
LRNEB	Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas
NaCl	Cloreto de Sódio
NAL	Ácido Nalidixico
NIT	Nitrofurantoina
O129	2, 4-Diamino-6, 7-di-iso-propylpteridine phosphate
ODC	Ornitina descarboxilase
Pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
Spp.	Espécies
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TBE	Tris-Borato-Edta
TCBS	Tiosulfato Citrato Bile
TCY	Tetraciclina
TSA	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
UCMR	The Unregulated Contaminant Monitoring Regulation
VP	Voges-Proskauer

1. INTRODUÇÃO

Se avaliarmos a evolução do conhecimento sobre o gênero *Aeromonas*, podemos refletir sobre o conhecimento quanto à evolução da bacteriologia médica, que se estende por mais de um século. Desde seu *primo* isolamento em 1890, diversos eventos discutiram inúmeros aspectos do gênero e alguns destes, que tiveram lugar ao longo do século passado, são fundamentais para a compreensão de questões atuais sobre este grupo de bactérias.

Ao observarmos a quantidade de vezes que o termo *Aeromonas* aparece citado no banco de dados do site americano Pub Med, uma das maiores fontes de pesquisa de artigos científicos, é possível perceber um aumento de importância do gênero a partir da década de 1980. No intervalo de 1944 a 1980 o termo *Aeromonas* aparece citado 662 vezes, já no intervalo de 1981 a 2013 são 5403 citações.

Aeromonas spp. são espécies bacterianas ubíquas do meio aquático podendo ser isoladas em águas estuarinas, marinhas e dulcícolas, sendo também encontradas na água clorada (EPA, 2006).

Inicialmente, espécies de *Aeromonas* eram reconhecidas apenas em doenças sistêmicas de animais pecilotérmicos. Atualmente o gênero é considerado além de agente relevante em infecções de peixes e outras espécies de sangue frio, bem como responsável por uma variedade de infecções humanas tanto em indivíduos saudáveis quanto em imunodeprimidos, na qual sua maior prevalência é observada em imunocomprometidos, ocasionando diferentes tipos de infecção com maior casuística no trato respiratório além de septicemia. Na década de 1980, apenas quatro espécies eram reconhecidas (*Aeromonas hydrophila*, *A. punctata*, *A. salmonicida*, e *A. sobria*). Atualmente, o gênero inclui acima de 30 espécies e finalmente o primeiro genoma completo de uma cepa de *Aeromonas* (ATCC 7966) foi sequenciado. Essas conquistas são um testemunho não só da revolução genômica molecular, mas também do quanto os conhecimentos científicos e clínicos sobre este gênero evoluíram em 117 anos (Janda; Abbott, 2010).

O primeiro caso de infecção por *Aeromonas* foi relatado na Jamaica em 1954 em uma mulher e em 1961 uma cepa foi isolada de fezes humanas, desde então

este patógeno tem sido indicado como causador de doenças diarreicas. Durante os últimos anos o número de estudos realizados com o gênero *Aeromonas* vem aumentando, bem como seu reconhecimento como agentes causadores de doenças humanas (Von Graevenitz, 2007; Parker; Shaw, 2011).

Infecções humanas podem ser divididas em dois grupos: intestinais e extra intestinais (Janda; Abbott, 1998). *A. hydrophila*, *A. caviae*, e *A. veronii* biovar *sobria* são as mais comumente associadas com infecções em humanos e somam mais de 85% dos isolados clínicos pertencentes a esse gênero (Vila *et al.*, 2003; Al-Benwan *et al.*, 2007). Avaliando a literatura é possível observar o aumento de infecções de ferimentos em pacientes imunocomprometidos, infecções gastrointestinais e inúmeras associações com quadros de septicemia, meningite, osteomielite, gastroenterite e peritonite bacteriana espontânea (Merino *et al.*, 1995; Albert *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2008).

São amplamente isoladas de amostras clínicas, ambientais e alimentares onde podem se desenvolver até mesmo em baixas temperaturas e produzir toxinas, o que aumenta significativamente o risco de infecção de origem alimentar (Igbinsosa, 2012; Khajanchi *et al.*, 2010).

Seu isolamento é mais elevado nos meses de verão, particularmente em países do hemisfério norte. Esse aumento se deve ao fato de que espécies mesófilas apresentam crescimento ótimo em águas com temperaturas mais elevadas, levando ao aumento da concentração bacteriana em ambientes de água doce bem como nos reservatórios de abastecimento doméstico. Em regiões de clima tropical podem ser detectadas durante todo o ano (Khardori; Fainstein, 1988; Edberg; Browne; Allen, 2007).

Possuem ampla distribuição geográfica, sendo capazes de determinar infecções em animais e no homem (Deodhar; Saraswathi; Varudkar, 1991). Comumente encontradas em ambientes aquáticos são reconhecidas como patógenos eventuais de répteis, peixes e em algumas espécies de mamíferos. Reconhecidos como patógenos emergentes, sua situação é privilegiada quando da ocorrência de desastres naturais, tendo sido amplamente isoladas em sobreviventes do tsunami que assolou a Tailândia em 2004 (Hiransuthikul *et al.*, 2005).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TAXONOMIA

De acordo com o relatado por Isonhood e Drake (2002), a palavra “*Aeromonas*” deriva do termo grego *aer* que significa ar ou gás, e *monas*, que significa unidade. O gênero *Aeromonas* compreende bacilos Gram-negativos oxidase e catalase positivos e resistentes a 150µg do agente vibriostático 2,4 diamino-6,7-diisopropilpteridina (O/129). São quimiorganotróficos e apresentam metabolismo oxidativo e fermentativo da glicose. Ubiquitária em ambientes aquáticos podem ser encontradas em ambientes marinhos, lagos, rios e também em água potável (Martin-Carnahan; Joseph, 2005; Horneman *et al.*, 2007; Janda; Abbott, 2010; Aravena-Román *et al.*, 2011).

O gênero é descrito como patógeno de peixes, répteis e anfíbios desde 1891, entretanto *Aeromonas* só foram associadas a infecção humana há poucas décadas (Castro-Escarpulli *et al.*, 2002).

Considera-se que a primeira descrição de uma cepa de *Aeromonas* foi realizada por Sanarelli em 1891, durante um estudo da imunidade em rãs, em que muitas desenvolveram septicemia que foi atribuída ao *Bacillus hydrophilus fuscus*. Ao longo deste tempo, *Aeromonas* têm sido isoladas de água, peixes doentes e leite (Farmer *et al.*, 2006). A primeira associação de *A. salmonicida* com furunculose foi descrita em 1894 por Emmerich e Weibel (Farmer *et al.*, 2006). Desde o primeiro isolamento até 1943, ano em que se definiu o gênero (Stainer, 1943), *Aeromonas* foram incluídos em diversos grupos, tais como o *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* ou *Vibrio*, entre outros. De fato, a definição do gênero *Aeromonas* tem sido atribuída erroneamente a Kluver e van Niel em numerosos livros de texto de microbiologia, embora a Comissão Judicial do Comitê Internacional de Bacteriologia Sistemática (1973) estabeleceu a autoria a Stainer, 1943.

Segundo Colwell *et al.*(1986) e Holt (1994) o gênero *Aeromonas* estaria ligado taxonomicamente à família *Vibrionaceae* (“Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”, 9ª edição) a qual incluiria também os gêneros *Vibrio*, *Photobacterium*, e *Plesiomonas*.

Devido a semelhanças fenotípicas, foram consideradas membros da família Vibrionaceae durante vários anos (Popoff, 1984), entretanto, o avanço dos estudos de hibridização e da caracterização da sequência 16S-rRNA demonstraram que esses microrganismos são evolutivamente diferentes do gênero *Vibrio* e da família Enterobacteriaceae, o que levou à proposição de uma família independente – a família Aeromonadaceae (Cowell *et al.*, 1986) por possuírem diversas espécies e características genéticas e fenotípicas próprias. Os gêneros pertencentes àquela família são bacilos Gram negativos que apresentam codificação genética para a síntese de enzimas citocromo oxidase, que os diferencia de outras bactérias com características semelhantes. A última edição do Manual de Bergey aponta três gêneros na família Aeromonadaceae, incluindo *Aeromonas*, *Oceanimonas* e *Tolumonas*, sendo este último considerado de forma incerta (Martin-Carnahan; Joseph, 2005).

A taxonomia de *Aeromonas* é muito confusa e na avaliação fenotípica, inúmeras características bioquímico-metabólicas são necessárias para uma classificação acurada (Martin-Carnahan; Joseph, 2005; EPA, 2006). Entre os fatores que complicam a identificação dessas bactérias estão o elevado número de grupos taxonômicos reconhecidos e necessidade de testes os quais não são utilizados na rotina dos laboratórios clínicos para diferenciação de outros grupos (Janda; Abbott, 2010).

Um esquema clássico de taxonomia as divide em dois grupos: o primeiro inclui cepas psicrófilas, com crescimento entre 22 e 28°C, o qual inclui espécies capazes de determinar patogenicidade em peixes de importância econômica. O segundo grupo, as mesófilas com crescimento entre 36 e 37°C (Horneman *et al.*, 2007) entre as quais se encontram espécies capazes de determinar infecções no homem (Hofer *et al.*, 2006; Janda; Abbott, 2010).

De acordo com a última edição do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology existem 14 fenoespécies e 18 genoespécies ou HG (Martin-Carnahan; Joseph, 2005), nem todas relacionadas à infecção humana. Entretanto novas espécies vêm sendo descritas e atualmente 24 são reconhecidas: *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii* (biovar *sobria* e *veronii*), *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*, *A. encheleia*, *A. popoffii*, *A. culicicola*, *A. aerequipenses*, e as descritas posteriormente

ao Bergey's Manual: *A. simiae* (Harf-Monteil *et al.*, 2004), *A. molluscorum* (Miñana-Galbis *et al.*, 2004), *A. tecta* (Demarta *et al.*, 2008), *A. aquariorum* (Martinez-Murcia *et al.*, 2008), *A. taiwanensis* e *A. sarnarelli* (Alperi *et al.*, 2009), *A. piscícola* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009), *A. fluvialis* (ALPERI *et al.*, 2010), *A. rivuli* (Figueras *et al.*, 2010) e *A. diversa* (Miñana-Galbis *et al.*, 2010).

Podem ser consideradas, ainda, espécies agrupadas em grupos fenotípicos ou complexos, cuja separação é efetuada através da combinação de testes bioquímicos convencionais: complexo *A. hydrophila*, complexo *A. caviae* e complexo *A. veronii*. O primeiro é constituído por: *A. hydrophila*, *A. bestiarum* e *A. salmonicida*, sendo *A. hydrophila* a espécie mais comumente associada a infecções humanas (Horneman *et al.*, 2007).

Em particular o complexo *A. caviae* é composto pelas espécies *A. caviae*, *A. media* e *A. eucrenophila*. Sendo a primeira espécie a mais comumente associada a infecções humanas, cuja gravidade está relacionada ao seu elevado potencial de virulência, especialmente em casos de sepsis e infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos (Pereira *et al.*, 2008).

Apesar da grande heterogeneidade do gênero, as espécies mais comumente associadas a infecções em humanos são *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biotipo *sobria* (Ghenghesh *et al.*, 2008). No Brasil estudos apontam *A. caviae* como a espécie mais prevalente (Freitas *et al.*, 1993;1998; Nojimoto *et al.*, 1997; Hofer *et al.*, 2006). Isolados desta espécie apresentam importante papel como patógenos entéricos, principalmente em crianças. Ocasionalmente mais frequentemente gastroenterite, mas podem vir a determinar diferentes infecções no homem como de pele e tecidos moles, septicemia, ocular, do trato respiratório e outras (Rodrigues; Ribeiro, 2004).

É importante ressaltar que devido à dificuldade de identificação desse gênero, algumas espécies são erroneamente tipadas como novas quando, na verdade, já foram descritas (Janda; Abbott, 2010).

2.2 ECOLOGIA

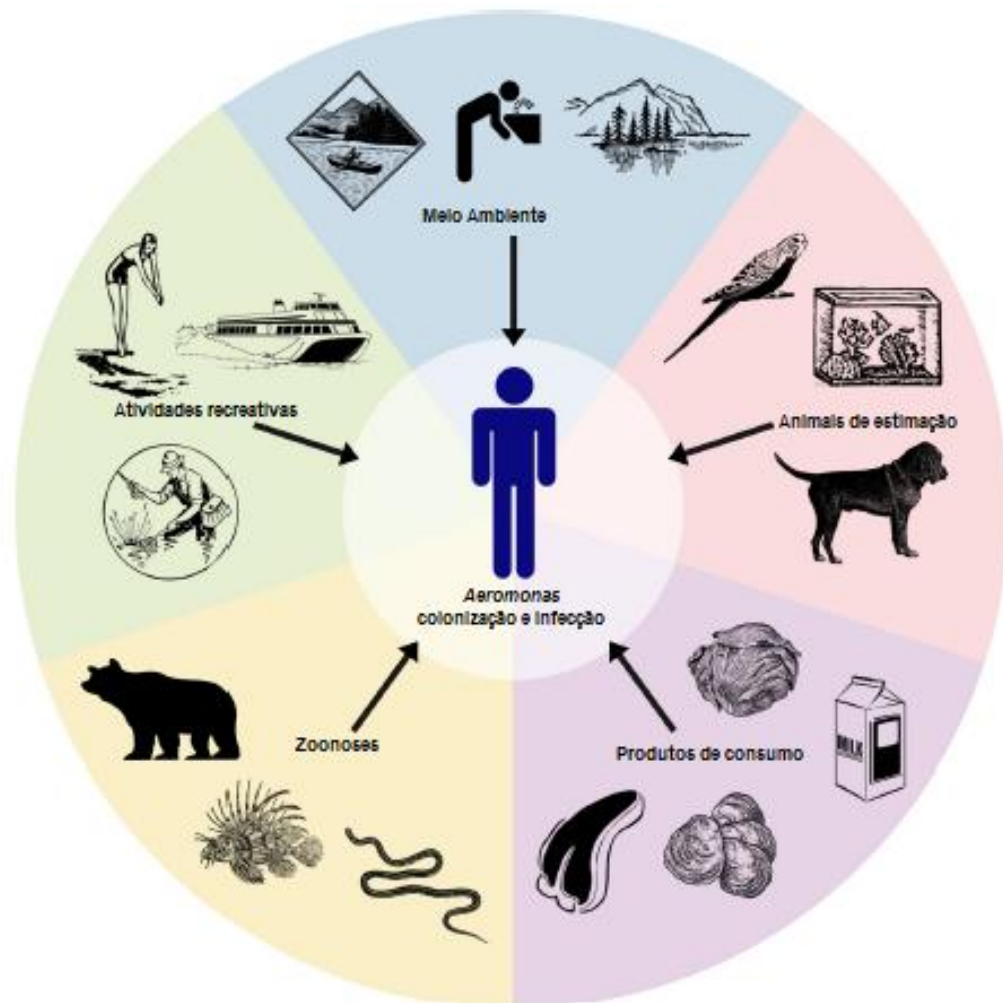
Aeromonas são encontradas em praticamente todos os ambientes aquáticos como rios, lagos, lagoas de água salgada ou salobra, água potável, subterrânea, residual e de esgoto (Horneman *et al.*, 2007). Podem ser recuperadas a partir de água potável que atende aos padrões de qualidade para organismos indicadores (Pablos *et al.*, 2009).

Outra característica de relevância é sua capacidade de fixação às superfícies de estruturas ou formação de biofilme. Vários autores sustentam que espécies de *Aeromonas* são suscetíveis ao tratamento com cloro realizado em estações de tratamento de água para uso doméstico e que a existência destas bactérias poderia ser devido à presença de biofilmes (Joseph; Carnahan, 2000), ou também à diminuição nos níveis de cloro livre na água levando, portanto, a incapacidade de manter a concentração residual de cloro necessária para eliminar estes microrganismos (EPA, 2006).

A capacidade de formar biofilme tem papel importante na sobrevivência destes microrganismos, dada a concentração dos nutrientes nas superfícies, que favorece sua sobrevivência durante *stress* osmótico e químico, além de quaisquer condições inadequadas. Esta característica permite associar e reconhecer sua relevância, particularmente na patogênese de pacientes portadores de infecções pulmonares crônicas como fibrose cística, cárie dentária entre outras.

A elevada prevalência de *Aeromonas* spp. no ambiente pode ser vista como ameaça à Saúde Pública (figura 1). Estes microrganismos também podem ser isolados a partir de vários alimentos (Evangelista-Barreto *et al.*, 2006; Galindo *et al.*, 2006), como vegetais, leite, carne e frutos do mar (Kirov *et al.*, 1993; Merino *et al.*, 1995) o que corrobora que a transmissão aos humanos ocorre através da ingestão de água e alimentos contaminados, uma vez que essas bactérias não pertencem a microbiota intestinal normal.

Figura 1. Fontes potenciais de colonização e infecção por *Aeromonas* spp. em humanos (adaptado de Janda; Abbott, 2010)



Nos últimos 20 anos, inumeros estudos vem sendo realizados para determinar a incidencia e concentração de *Aeromonas* spp. em alimentos prontos ou semi prontos, cujos resultados indicam sua presença na maioria dos alimentos, independentemente da origem geográfica (Isonhood; Drake, 2002). Desde 1984, têm sido consideradas como potenciais agentes de infecções alimentares (Buchanan, 1984), como exemplo cita-se surto após a ingestão de camarões contaminados relatado por Altwegg *et al.*(1991) e um surto por *Aeromonas hydrophila* após ingestão de salada contaminada em uma faculdade na China (Altwegg *et al.* 1991).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) vem realizando monitoramento sobre sua ocorrência em concessionárias de água potável selecionados desde 2003. *Aeromonas* está incluída na lista de candidato a

contaminante (*Contaminant Candidate List – CCL*) da água pela Agência de Proteção Ambiental Americana (*U.S. Environmental Protection Agency*), que recomenda aprofundar os conhecimentos e pesquisar a presença de *Aeromonas* em água para consumo (EPA, 2006). Além disso, também está presente na lista do FDA (*Food and Drug Administration*) como patógeno presente em alimentos – *Foodborne Pathogen Microorganisms* (Food and Drug Administration, 2004) e deve ser considerado como patógeno emergente (Merino *et al.*, 1995).

A Agência Ambiental do Reino Unido estabeleceu a obrigatoriedade do isolamento e contagem através de membrana filtrante de *Aeromonas* mesófilas em água potável em diversos estágios de tratamento e distribuição tendo em vista a ampla distribuição e a capacidade infectante desses microrganismos (Standing Committee of Analysis – Environment Agency UK, 2010).

Sua sobrevivência no ambiente depende de fatores físicos e químicos tais como temperatura, pH, salinidade da água e da disponibilidade de nutrientes. De acordo com Popoff, (1984), a maioria das espécies de *Aeromonas* spp. crescem numa faixa de temperatura de 5°C a 41°C, excetuando-se *A. salmonicida* que apresenta a faixa de temperatura ótima de crescimento entre 22°C e 28°C.

Os estudos de Palumbo; Morgan; Buchanan (1985), e Varnam e Evans (1996), afirmaram que cepas de *A. hydrophila*, presentes em alimentos são capazes de crescer em baixas temperaturas numa faixa de aproximadamente -0,1°C a +1,2°C, desse modo, sendo garantido seu desenvolvimento na temperatura de 4°C.

Varnam e Evans (1996) apontaram 42°C como temperatura máxima de crescimento de *Aeromonas* spp. e, Euzéby (2003), afirmou ser possível à todas as linhagens crescerem à 42°C depois de 24 a 48 horas de incubação. Entretanto estudos enfatizam que a *Aeromonas hydrophila* é bastante sensível ao calor sendo inativada a 45°C (Varnam; Evans 1996).

No estudo de Palumbo *et al.*(2001), verificou-se que em várias reações bioquímicas de cepas de *Aeromonas* móveis isoladas de alimentos, são observados resultados diferenciados de acordo com a temperatura de incubação.

Em *Aeromonas* spp. a tolerância ao sal pode variar de acordo com as cepas e as demais condições do meio. Palumbo; Morgan; Buchanan. (1985) verificaram o crescimento das cepas BA2 e BA7 de *A. hydrophila*, em caldo “*Brain Heart Infusion*”

(BHI) com 5% de cloreto de sódio (NaCl), quando incubado na temperatura ótima de 28°C. Os autores relatam que a maioria das cepas crescem em concentrações em torno de 2% a 4% de NaCl, entretanto existem algumas que necessitam da presença de no mínimo 0,3% e outras que não necessitam desse sal para seu desenvolvimento.

As *Aeromonas* spp. são bactérias sensíveis a pH inferior a 6,0, esses microrganismos não são ácido resistentes, todavia podem se adaptar a situações de *stress* ocasionadas por ácidos, produzindo proteínas defensivas. A *A. hydrophila* em certos tipos de alimentos, não cresce quando o pH é inferior a 6,0 e o conteúdo de sal é de 3%. A tolerância ao pH e à concentração de sal variam com a temperatura. (Palumbo; Morgan; Buchanan, 1985)

Segundo Isonhood e Drake (2002), cepas de *A. hydrophila* suportam variações de pH entre 5,5 a 9,0 porém, é em pH neutro ou levemente alcalino que acontece o melhor crescimento. Garcia-López *et al.*(2004) e Varnam e Evans (1996) indicaram que as condições melhores para o crescimento de *Aeromonas* spp. ocorre em pH maior que 6,0 e concentração de NaCl menor que 4%. Existe forte correlação entre o valor de pH e a tolerância ao NaCl, de modo que pequenas mudanças nos valores de pH podem resultar em mudanças na tolerância ao NaCl. (Garcia-López *et al.*, 2004; Popoff, 1984; Varnam; Evans, 1996).

A presença de bactérias heterotróficas pode inibir o crescimento de *Aeromonas*, o que sugere que a competição por nutrientes é um fator limitante para a sua manutenção no meio ambiente (Mary *et al.*, 2001). Além disso, em condições de estresse ambiental, *Aeromonas* provoca sua própria morte celular, situação conhecida como “fenômeno suicida” (Namdari; Cabelli, 1989). Em 2001 Ballal *et al.* mostraram que *Aeromonas* não suicidas são mais letais em camundongos do que as suicidas, sugerindo uma relação entre fenômeno suicida e virulência, entretanto essa associação ainda não foi comprovada.

2.3 INFECÇÃO

Espécies de *Aeromonas* spp. atualmente são consideradas patógenos emergentes, e têm sido isoladas e indiciadas como agente etiológico em vários processos infecciosos. São reconhecidas como agentes etiológicos de uma variedade de doenças tanto no homem quanto em animais (Guerra *et al.*, 2007; Janda; Abbott, 2010).

Estão associadas com ampla variedade de infecções em animais de sangue quente e frio, incluindo rã, répteis, cobras, peixes e humanos. Nas rãs causa doença da pata vermelha. Nas cobras, lagartos e jacarés, pode provocar quadros distintos: estomatite ulcerativa ou boca podre e pneumonia grave. Produz furunculose nos peixes, com lesão necrótica focal em vários músculos, podendo evoluir para septicemia fatal. Esta última é caracterizada pela presença de pequenas lesões superficiais, hemorragia das guelras e ânus, úlceras, abscessos, exoftalmia e inchaço abdominal. Outra patogênese é conhecida como “doença vermelha das barbatanas”, sendo caracterizada pela presença de nódulos hemorrágicos nas mesmas, além de erosão de escamas. Há relatos de septicemia em cachorro, dermatite e pneumonia em golfinhos, aborto em vacas, putrefação negra em ovos de galinha e diarreia em porcos (George *et al.*, 1985; Farmer *et al.*, 1992; Janda; Abbott, 1998; Janda; Abbott, 2010).

As doenças de peixes são importante fator limitante no desenvolvimento de sistemas de aquicultura e todos os peixes são suscetíveis a infecções bacterianas, não sendo possível evitar sua propagação, uma vez que esses microrganismos ocorrem naturalmente no ambiente aquático. Entre estes as *Aeromonas* móveis são onipresentes no ambiente aquático e um habitante normal do intestino de peixes, sendo as septicemias causadas por *Aeromonas* móveis um problema comum em todo o mundo e em todas as espécies de peixes de água doce (Janda; Abbott, 2010).

No homem as infecções causadas por *Aeromonas* podem ser divididas em: síndromes do trato gastrointestinal, infecções de feridas e de tecidos moles, septicemia e diversos outros processos infecciosos que incluem uma infinidade de doenças menos frequentes (Janda; Abbott, 1998; Janda; Abbott, 2010) como

infecções respiratórias, urinárias (Al-Benwan *et al.*, 2007), oculares (Sohn *et al.*, 2007), e ósseas (Gómez-Garcés *et al.*, 2011).

Nem todas as espécies de *Aeromonas* spp. são encontradas com igual frequência nas várias síndromes. Por exemplo, *A. caviae*, causa mais comum de gastroenterite benigna autolimitada, raramente é encontrada como causa de infecção extra intestinal, especialmente septicemia. Infecções extra intestinais são usualmente secundárias a gastroenterite (ex. septicemia) ou devido a injúrias traumáticas com subsequente contato com água contaminada (Janda; Abbott, 1998; Janda; Abbott, 2010).

2.3.1 Infecções intestinais

A gastroenterite é a manifestação clínica mais frequente envolvendo as espécies desse gênero, no qual a infecção de forma branda, acompanhada por diarreia aquosa, autolimitada e de curta duração a forma observada na maioria dos casos. Além deste quadro, podem ocorrer formas mais severas tanto semelhantes à disenteria, com fezes sanguinolentas, vômitos e dores abdominais, do mesmo modo que infecções coleriformes, semelhantes à cólera e colite (Janda; Abbott, 1998; Janda; Abbott, 2010).

A gastroenterite causada por *Aeromonas* pode variar de moderada a grave. Embora estudos realizados com voluntários apresentassem falhas quanto a produção de doenças, a partir de cepas portadoras de fatores de virulência, a maioria das avaliações epidemiológicas aponta que sua presença está associada à diarreia e raramente ao estado de portador. De acordo com o relato de Champsaur *et al.*(1982), a gastroenterite causada por *Aeromonas* spp. se caracteriza por diarreia aquosa, que ocorre em 75% dos casos, ou por disenteria. A severidade da infecção depende diretamente dos fatores de virulência envolvidos e do estado imunológico do paciente (Ender *et al.*, 1996)

Outros fatores de risco predisponentes as infecções incluem hospitalização, terapia antimicrobiana, metabolização do ácido gástrico ou inibição da secreção ácida, cirurgia gástrica e sangramento do trato gastrointestinal (Namdari; Bottone, 1991).

Estudos com população de todas as idades aponta *A. caviae* como a espécie mais frequentemente isolada, seguida da *A. hydrophila* e *A. veronii*. Nos países não tropicais o percentual de portadores assintomáticos encontra-se em torno de 1%, enquanto nos países tropicais esse percentual é de 20% (Falgás, 2003).

Borsh *et al.*(1974) e Sugita *et al.*(1995), relataram que *Aeromonas* spp. pode ser encontrada na microbiota de caráter transitório, nas fezes de humanos, de animais terrestres e aquáticos, sendo que este *habitat* parece não merecer importância em saúde pública, ficando a água utilizada nas indústrias de beneficiamento como principal responsável pelas contaminações de alimentos (Rodrigues, 2007).

Isonhood e Drake (2002) caracterizaram como grupos considerados de risco quanto à infecção por *A. hydrophila*, as crianças, os idosos e os imunodeprimidos. No estudo de Nojimoto *et al.*(1997), foram isoladas: *A. caviae* (7,7%); *A. salmonicida* (6,6%); *A. sobria* (4,3%); *A. hydrophila* (2,2%) e *A. achromogenes* (1,1%), em 72 fezes diarreicas de crianças menores de cinco anos no período de 1995 a 1996.

Na população pediátrica, a gastroenterite causada por *Aeromonas* spp. é particularmente problemática, pode-se observar índices de 2 a 20% das crianças na população mundial sofrendo de diarreia provocada apenas por espécies de *Aeromonas*. Considerando ainda as crianças infectadas por *Aeromonas* apenas 2% não apresentam sintomas diarreicos (Galindo *et al.*, 2006).

Zanella *et al.*(2004) avaliaram amostras de fezes de trabalhadores de aviários em comparação a amostras controle de pessoas da comunidade. As amostras do grupo controle apresentaram resultado negativo para *Aeromonas* spp. Em 14,81% das amostras dos trabalhadores foram isoladas cepas de *Aeromonas*: 44,4% *A. hydrophila*, 33,3% *A. sobria* e 16,6% *A. caviae*. 61,1% das apresentaram os cinco fatores de patogenicidade, a atividade hemaglutinante identificada em 100% dos isolados; 83,3% apresentaram atividade hemolítica; em 66,6% foram detectadas a atividade lipolítica e a atividade proteolítica e 61,1% eram formadores de biofilmes. Com base nesses resultados concluiu-se que a ocorrência de espécies patogênicas de *Aeromonas* spp. nas fezes de trabalhadores de aviários, permite considerá-la como potencial agente causador de DTA.

Existe um crescente interesse sobre os fatores de virulência da *A. hydrophila* e sua correlação com os casos de gastroenterite humana, já que muitos desses fatores ainda não foram elucidados (Garcia-López *et al.*, 2004).

2.3.2 Infecções extra intestinais

Na literatura estão descritos casos de infecções extra-intestinais onde *Aeromonas* spp. podem ser consideradas agente etiológico, como infecções superficiais devido ao contato com águas contaminadas, infecções em pacientes com processos neoplásicos, hematológicos, com disfunções hepatobiliares e infecções em pacientes com ou sem outras enfermidades, porém em menor frequência são relatados ocorrência de meningite, infecção urinária, endocardite, osteomielite, amidalite e otite média (Janda; Abbott, 1995; Janda; Abbott, 1998). Em 2004, Garcia-López *et al.* afirmaram que existe envolvimento da *Aeromonas* spp. em casos de septicemia, meningite, peritonite, endocardite, alterações do trato respiratório, infecções oculares e síndrome urêmica hemolítica.

Em 1954 foi diagnosticado o primeiro caso de septicemia por *Aeromonas* spp. em um paciente de 40 anos previamente sadio, que morreu 48 horas após o início do quadro clínico. Desde então, o número de casos tem aumentado progressivamente. Contudo, nem todos os casos são devidamente acompanhados de dados clínicos e microbiológicos, de modo que seja possível estabelecer a prevalência do isolamento ou definir o poder patogênico da espécie (Falgás, 2006).

Qadri *et al.*(1976) relatam uma meningite causada por *A. hydrophila* ocorrida após uma craneotomia fronto-temporal. Segundo os autores, *A. hydrophila* era conhecida por causar bacteremia em pacientes sob o tratamento com agentes imunossupressores, porém, no caso em questão o paciente era imunologicamente sadio.

Janda e Abbott (1998) apontam como enfermidades mais comumente associadas aos quadros de septicemia causada por *Aeromonas* spp. são: a leucemia, determinados tipos de câncer (40 a 50%), as enfermidades hepatobiliares (15 a 30%), a diabetes (3 a 5%) e desordens diversas, incluindo a pancreatite, traumatismos, anomalias cardíacas, desordens gastrintestinais, anemia e problemas respiratórios.

As espécies reconhecidas como causadoras de infecções septicêmicas em humanos são: *A. hydrophila*, *A. veronii* bv *sobria*, *A. veronii* bv *veronii*, *A. caviae*, *A. jandaei*, *A. schubertii* e *A. trota* (Carnahan *et al.*, 1991; Khardori; Fainstein, 1988, e Thomsen; Kristianse, 2001).

2.3.2.1 Infecção de ferimentos

Infecções em ferimentos são a segunda maior fonte de isolados clínicos de *Aeromonas* spp. no qual *A. hydrophila* o agente causal da maioria. Assim como a gastroenterite, os sintomas clínicos associados com infecções em ferimentos causadas por *Aeromonas* costumam variar de pessoa a pessoa, de acordo com o estado imune do hospedeiro. Abrangem desde infecções superficiais moderadas (por exemplo, celulite) a infecções profundas mais sérias como ectima gangrenosa e mionecrose, que envolvem fáscia, tendões, músculos, ossos e juntas. Na maioria dos casos de ferimentos infeccionados por *Aeromonas* spp. (82%) ocorre a entrada da bactéria em indivíduos saudáveis através de abrasões ou cortes, frequentemente (43%) em associação com exposição recreacional ou ocupacional a ambientes aquáticos contaminados com a bactéria. (Galindo *et al.*, 2006).

O solo contaminado também é uma fonte para a infecção de ferimentos, totalizando um terço das infecções nos pés associados com *Aeromonas*. O contato com solo ou objetos inanimados recobertos com solo contaminado é também fonte de ferimentos infectados por *Aeromonas* secundários a trauma severo. Danos que acontecem em ambientes contaminados com a bactéria podem levar a grave infecção destes ferimentos, incluindo mionecrose, gangrena gasosa sinérgica ou infecções ósseas (Janda; Abbott, 1998; Galindo *et al.*, 2006; Tena *et al.*, 2007; Tao *et al.*, 2009).

Infecções nosocomiais associadas com *Aeromonas* também têm sido reportadas, tais infecções são caracteristicamente causadas através transferência da bactéria de áreas infectadas para tecidos estéreis por de intervenções médicas, tais como cirurgias. Raramente infecções em ferimentos por *Aeromonas* se desenvolvem em pessoas que não sofreram trauma e não possuem qualquer doença subjacente (Galindo *et al.*, 2006).

2.4 DIAGNÓSTICO

São características comuns ao gênero: serem bacilos Gram-negativos, oxidase positivos, não formadoras de esporos, que apresentam mobilidade pela presença de flagelo polar sendo seu metabolismo do tipo anaeróbio facultativo. Em geral são resistentes ao agente vibriostático O/129 (2,4-diamino 6,7-diisopropyl pteridina) nas concentrações de 10 e 150µg (Horneman *et al.*, 2007). Janda; Abbott (2010) sugerem que a diferenciação de *Aeromonas* e *Vibrio* é efetuada conforme descrito no quadro 1.

As amostras suspeitas de conter *Aeromonas* são inoculadas em meio de enriquecimento líquido (água peptonada alcalina – APA) e incubadas a 35-37°C durante 18-24h. São semeadas em placa de ágar GSP no qual é possível verificar a atividade da enzima amilase que é característica do gênero. As colônias crescidas em placa são submetidas ao teste da oxidase para diferenciar das bactérias da família Enterobacteriaceae e ao teste do O/129 para diferenciar de *Vibrio* spp.

Para diferenciação entre as espécies de *Aeromonas* spp., Palumbo *et al.* (2001) descreveram a utilização das provas de descarboxilação da ornitina e da lisina, diidrólise da arginina, hidrólise da esculina, produção de gás da glicose, via da fermentação da glicose – Voges-Proskauer, indol e uso da arabinose.

Quadro 1: Diferenciação de *Aeromonas* spp. e *Vibrio* spp. (Adaptado de Janda; Abbott, 2010).

Organismo	Cresc. 0%NaCl	O/129	TCBS	LDC*	ADH*	ODC*
<i>Aeromonas</i>	+	R	NC	+ -	+ +	- -
<i>Vibrio cholerae/</i> <i>mimicus</i>	+	S	Sac+/Sac-	+	-	+
Outros <i>Vibrios</i>	-	S	Sac+/Sac-	-	+	-

LDC: lisina descarboxilase; **ADH:** arginina dehidrolase; **ODC:** ornitina descarboxilase, **NC:** não cresce; **Sac+:** sacarose positiva, **Sac-:** sacarose negativa (no meio de TCBS observa-se a fermentação da sacarose); **+**: reação positiva; **-:** reação negativa.

Embora várias espécies sejam patogênicas, *Aeromonas* não costumam ser pesquisadas rotineiramente nos laboratórios clínicos, o que dificulta a obtenção de dados epidemiológicos.

A identificação de *Aeromonas* por sistemas comerciais frequentemente resulta em erros. Muitas vezes ocorre classificação correta quanto ao gênero, porém com erro quanto à espécie (O'hara, 2006). Algumas vezes é possível observar identificação cruzada com membros da família Vibrionaceae (Park *et al.*, 2003). Os sistemas comerciais API 20E e Vitek, por exemplo, apresentam limitações em diferenciar corretamente as espécies de *Aeromonas*, classificando grande parte das cepas como *A. hydrophila* (Park *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2003), assim provocando uma superestimação dessa espécie como agente etiológico de infecções e ao mesmo tempo mascara a verdadeira incidência das outras espécies (Figueras, 2005).

Alguns autores indicam a utilização de métodos moleculares na identificação correta desses microrganismos (Castro-Escarpulli *et al.*, 2002; Figueras, 2005), embora grande parte dos laboratórios clínicos, especialmente nos países em desenvolvimento, não utilizem ferramentas moleculares de diagnóstico na rotina de suas análises (Ghenghesh *et al.*, 2008).

Métodos moleculares têm sido propostos, de maneira geral na identificação de isolados bacterianos. Alguns autores sugerem que a identificação das bactérias desse gênero seja realizada por meio de métodos moleculares em substituição aos convencionais. Janda; Abbott (2010) consideram essa abordagem como problemática em *Aeromonas* principalmente devido similaridade apresentada entre as sequências de nucleotídeos das espécies.

O gene que codifica o RNA ribossomal 16S (ou 16S rDNA) é considerado uma ferramenta valiosa ao fornecer sequências características para o delineamento e identificação da maior parte das espécies de *Aeromonas*. A aplicação de tal metodologia pode facilitar a identificação desse grupo de bactérias (Borrell *et al.*, 1997 e Figueras *et al.*, 2000).

Diversos protocolos de PCR-RFLP têm sido descritos para a identificação molecular das aeromonas, como os descritos por Graf, 1999 e Ghatak; Agarwal;

Bhilegaonkar, 2007. Entretanto ainda existem controvérsias quanto a sua utilidade na discriminação das espécies de *Aeromonas*.

Entretanto, na identificação de *Aeromonas* spp. ainda existem limitações devido ao quantitativo de isolados e similaridade das sequências gênicas entre as cepas (Lamy *et al.*, 2009). Há, inclusive, casos em que o sequenciamento do gene 16S rRNA se mostrou inconclusivo na identificação das espécies (Al-Benwan *et al.*, 2007).

Em 2004, Szczuka e Kaznowski realizaram a tipagem de *Aeromonas* spp. comparando as técnicas RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic) e ERICPCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus). Concluiu-se que as técnicas RAPD e ERIC-PCR possuem o mesmo poder discriminatório, enquanto que a técnica de REP-PCR se apresentou menos efetiva na diferenciação dos isolados de *Aeromonas* spp.

Ghatak; Agarwal; Bhilegaonkar (2007) propuseram a identificação de 53 cepas de *Aeromonas* spp. de importância médica isoladas de diferentes fontes através da restrição do gene 16S rDNA, utilizando as enzimas de restrição *Bst*SNI, *Mbol* e *Pvu*II. Os resultados obtidos indicaram que a técnica de RFLP aplicada com as enzimas propostas é capaz de identificar as espécies médicas importantes. Esses resultados ainda corroboraram com os testes fenotípicos realizados previamente para identificação das cepas.

2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

Aeromonas spp. possuem um amplo espectro de fatores envolvidos no processo de infecção incluindo colonização, invasão e proliferação do microrganismo, além de apresentar a habilidade de escape do sistema imunológico do hospedeiro (Janda, 2001; Zhiyong; Xiaoju ; Yanyu, 2002). Estes microrganismos são produtores de fatores de virulência extracelulares, como enterotoxinas, hemolisinas e adesinas, e possuem ainda, características estruturais, como pili, flagelo, proteínas de membrana externa e camadas “S”, capazes de atuar durante a infecção (Tomás, 2012). Também estão descritos mecanismos de motilidade, adesividade e invasividade celular nestes microrganismos (Janda, 2001)

A detecção dos fatores de virulência é um importante passo para determinar o potencial de patogenicidade dos isolados de *Aeromonas* (Chacón *et al.*, 2003), o qual é multifatorial envolvendo adesinas, sideróforos, lipopolissacarídeos, exoenzimas e exotoxinas (Guerra *et al.*, 2007).

Nos últimos anos tais microorganismos tem sido reconhecidos como agentes etiológicos relevantes em infecções gastrointestinais e extra intestinais. Ressalta-se que *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* o biogrupo *sobria* são consideradas de importância clínica (Guerra *et al.*, 2007). Nestas, a evidenciação dos fatores de virulência pode representar um importante elemento que auxilie no conhecimento quanto as cepas circulantes no ambiente.

A maioria das investigações sobre os possíveis fatores de virulência têm sido efetuadas em amostras isoladas de pacientes com infecções entéricas. Alguns determinantes como a hemolisina designada aerolisina, podem ser comuns em infecções entéricas e extraintestinais, enquanto nesta última outras, como a camada-S, são mais importantes (Tomás, 2012).

A variedade de formas clínicas em particular nas infecções intestinais sugere complexo mecanismo de patogenicidade. Para as demais manifestações é possível que apresentem múltiplos fatores de virulência em combinações diferentes, os quais podem interagir em diferentes níveis no intestino, possivelmente assim como a situação que ocorre entre os diferentes patótipos de *Escherichia coli* que causam infecção intestinal (Neves *et al.*, 1994 e Pianetti *et al.*, 2004).

Estudos recentes apontam que embora a realização de ensaios laboratoriais não permita o reconhecimento de alguns fatores de virulência, amostras de *A. caviae* inoculadas em trato intestinal de camundongos demonstraram sua colonização, o que poderia explicar a participação deste microorganismo na “diarreia dos viajantes” onde não são identificados fatores de virulência (Hayes *et al.*, 2010).

O gênero *Aeromonas* compreende ainda dois sistemas de secreção de proteínas: o sistema de secreção do tipo II (T2SS) e o do tipo III (T3SS). Estão envolvidos com a virulência e são responsáveis pelo transporte da proteína bacteriana através da membrana (Khajanchi *et al.*, 2009). São descritas quatro proteínas do tipo III: *aexT*, *aopP*, *aopH* e *aopO*, das quais as três últimas são codificadas em plasmídeo (Sierra *et al.*, 2007).

Aeromonas spp. têm capacidade de produzir biofilme que permite que essas bactérias se adaptem os diferentes ambientes em que se encontram, atuando como proteção e favorecendo sua sobrevivência (Agarwal *et al.*, 2007). O biofilme torna a bactéria capaz de aderir a qualquer superfície, inclusive à célula hospedeira de maneira que o microrganismo possa invadi-la (Rahman *et al.*, 2007).

A presença de flagelo polar é essencial para a colonização intestinal, já a expressão do flagelo lateral contribui na formação de biofilme através da ativação do mecanismo de *quorum sensing* bacteriano (Janda; Abbott, 2010). Uma vez agrupadas em biofilme, as bactérias expressam mais fatores de virulência, desse modo, a presença de flagelos pode ser considerada como importante marcador de sua patogenicidade (Merino *et al.*, 2006).

Aeromonas spp. são produtoras de uma grande variedade de enterotoxinas (Krovacek; Faris; Mansson, 1991; Majeed; Macrae, 1991), algumas têm efeito citotônico, como as codificadas pelos genes *alt* e *ast*, e outras atuam de maneira citotóxica, como as codificadas pelos genes *act*, *hlyA* e *aerA*. As exotoxinas citotóxicas, também conhecidas como enterotoxinas citolíticas, provocam degeneração das criptas e vilosidades do intestino, são capazes de gerar hemólise, citotoxicidade e enterotoxidade (Asao *et al.*, 1984; Chopra; Houston, 1999). As enterotoxinas citotônicas, por outro lado, não, causam danos nas vilosidades do intestino (Chopra; Houston, 1999). Considerando as toxinas produzidas por *Aeromonas* spp., a aerolisina, enterotoxina citotóxica codificada pelo gene *aerA*, é o fator de virulência mais bem estudado e caracterizado (Janda; Abbott, 1998).

A enterotoxina citotóxica Act produzida por *A. hydrophila* induz uma sinalização celular que leva a produção de mediadores inflamatórios em macrófagos e células epiteliais humanas e pode contribuir para apoptose (Ferguson *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998; Galindo *et al.*, 2006). Act é uma toxina formadora de poros relacionada à aerolisina responsável pelas ações hemolítica e citotóxica de *A. hydrophila*, assim, considerada seu principal fator de virulência. A hemólise envolve formação de poros na célula e entrada de fluidos do meio externo e subsequente lise. A toxina interage com a membrana do eritrócito e se insere na bicamada lipídica criando poros de 1.14 a 2.8nm (Sha; Kozlova; Chopra, 2002;).

A enterotoxina citotônica não produz degeneração do epitélio, seu mecanismo de ação é similar ao da toxina colérica aumentando os níveis de cAMP e prostaglandinas nas células do epitélio intestinal (Chopra; Houston, 1999). Essas enterotoxinas foram divididas em dois grupos: termo-lábil (Alt) e termoestável (Ast). Chopra; Houston (1999) purificaram Alt de *A. hydrophila*, que provoca aumento de cAMP e prostaglandinas na mucosa intestinal de ratos. Eles também detectaram Ast que aumenta a secreção de fluidos no intestino delgado de ratos e aumenta a elevação do cAMP nas células da mucosa.

Aeromonas spp. secretam ampla variedade de enzimas extracelulares incluindo proteases, lipases, amilases, quitinases, nucleases e gelatinases. Elas representam alto potencial de adaptação a alterações ambientais. As proteases contribuem para a versatilidade metabólica que permite a manutenção de *Aeromonas* em diferentes ambientes e interação com outros microorganismos. Estes contribuem ainda para a patogenicidade gerando danos teciduais no hospedeiro e ativação de toxinas proteolítica (Kirov, 1997). Em adição, contribuem para o estabelecimento da infecção superando as defesas iniciais do hospedeiro ou provendo nutrientes para proliferação celular (Leung; Stevenson, 1988).

Entre as várias enzimas extracelulares produzidas por *Aeromonas* destacam-se as proteases, as DNases, as lipases, as elastases, as amilases, as lecitinases e as gelatinases. Ainda não foram determinadas sua função nos mecanismos de virulência, mas sabe-se que as proteases podem contribuir para a patogenicidade, causando danos diretos aos tecidos ou aumentando a capacidade de invasão. Já as lipases, representadas pela glicerofosfolipídeo-colesterol- aciltransferase (CGAT), têm a propriedade de provocar a lise da membrana celular e de eritrócitos (Kirov, 2001; Merino *et al.*, 1995).

As lipases, ou triacilglicerol hidrolases, produzidas podem prover nutrientes e constituir um fator de virulência. Elas interagem com os leucócitos humanos e são capazes de afetar as funções do sistema imunológico devido à liberação de ácidos graxos livres gerados pela ação lipolítica (Chuang *et al.*, 1997; Pemberton *et al.*, 1997). A enzima glicerofosfolipídeos-colesterol aciltransferase digere a membrana dos eritrócitos e ocasiona lise (Pemberton *et al.*, 1997; Merino *et al.*, 1999).

2.6 RESISTENCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Ao longo dos anos relatos sobre resistência em *Aeromonas* spp. tem sido descritos. Goñi-Urriza *et al.*(2000) avaliaram a atividade de 19 agentes antimicrobianos frente a *Aeromonas* spp. isoladas de dois rios na Europa e encontram cepas resistentes a maioria das drogas avaliadas. Fosse *et al.*(2003) identificaram 5 diferentes perfis fenotípicos de *Aeromonas* spp. produtoras de β -lactamases. Sinha *et al.*(2004) avaliaram os padrões de suscetibilidade aos antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* isoladas de casos de disenteria na Índia encontrando isolados resistentes a quinolonas e aminoglicosídeos.

O maior mecanismo de resistência em *Aeromonas* se dá através de enzimas β -lactamases cromossomais induzíveis com atividade contra diversos antimicrobianos β -lactâmicos como penicilinas, cefalosporinas e cefalosporinas de espectro estendido. As principais classes reconhecidas em *Aeromonas* spp. são: classe C - cefalosporinases, classe D - penicilinas e classe B - metalo- β -lactamases, esta última com atividade frente aos carbapenemas e cuja expressão vem crescendo (Janda; Abbott, 2010).

Já foram descritas nesse gênero algumas enzimas de resistência a antibióticos como metalocarbapenemases – *CphA*, cefalosporinases – *CepH* e oxacilinases – *AmpH* (Balsalobre *et al.*,2009). O perfil de resistência em antimicrobianos β -lactâmicos tem sido relacionado com o tipo de β -lactamase, como por ex. *bla*_{VIM-4} em *A. hydrophila* carregados por um integron de classe 1, o gene *bla*_{IMP-19} em *A. caviae*, *A. veronii* genes das classes B e D β -lactamase (Neuwirth *et al.*, 2007; Libisch *et al.*, 2008). Ye *et al.*(2010) realizaram o primeiro relato do isolamento de *A. caviae* multirresistente carregando os genes codificadores das β -lactamases TEM-1, CTX-M-3 e MOX-4, conferindo resistência a todos os β -lactâmicos exceto imipenem. MOX-4 é uma β -lactamase do tipo Amp-C plasmidial que pode ser transferida através de conjugação para bactérias naturalmente negativas para Amp-C cromossomais (Ye *et al.*, 2010).

Já foi observada resistência a tetraciclina codificada por variantes do gene *tet*, como *tetD* em *A. hydrophila* (Aoki *et al.*, 1987). Na última década alguns autores

constataram a presença dos genes *tetA* e *tetE* em amostras provenientes de alimentos e amostras clínicas (Balassiano *et al.*, 2007).

Atualmente é possível observar um aumento da resistência bacteriana às quinolonas. Estes genes codificam proteínas de repetição pentapéptido que bloqueiam a ação de ciprofloxacina no DNA girase e topoisomerase IV bacterianas (Park *et al.*, 2006).

Sinha *et al.*(2004) detectaram elevado nível de resistência cromossomal as quinolonas: ácido nalidixico, ciprofloxacina e norfloxacina em isolados de *A. caviae* de pacientes com diarreia. Essa resistência pode ser codificada pela presença do gene *qnr* integrado a um cassete gênico como descrito por Cattoir *et al.*(2008).

A presença de *QnrS* com 41% a 60% identidade nas sequências de aminoácidos de *QnrA* foi verificada em dois isolados ambientais de *A. media* e *A. caviae* e um isolado clínico de *A. veronii*, sendo que esta última apresentou resistência a quinolona e as fluoroquinolonas, ciprofloxacina e levofloxacina (Sanchez-Céspedes *et al.*, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL:

Determinar em cepas de *Aeromonas* spp. isoladas da cadeia alimentar a capacidade de produção, através de testes feno e genotípicos, dos fatores de virulência e de albergar e disseminar genes de resistencia aos antimicrobianos de ultima geração.

3.2 ESPECÍFICOS:

- Efetivar a seleção de cepas de origem humana e animal isoladas de quadros patognômicos e de meio ambiente, no banco de dados
- Efetuar a caracterização fenotípica da virulência
- Determinar a presença de genes de virulência
- Caracterizar fenotipicamente a resistência a drogas antimicrobianas
- Caracterizar os genes de resistência antimicrobiana a drogas de ultima geração

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DE CEPAS

A partir do banco de dados do LRNEB, foram selecionadas cepas de *Aeromonas* spp. oriundas de fontes humana, ambiental e animal isoladas no período de 2008 a 2012 (quadro 2).

Quadro 2: Distribuição das cepas por ano

	2008			2009			2010			2011			2012		
	HU	AB	AN	HU	AB	AN	HU	AB	AN	HU	AB	AN	HU	AB	AN
<i>A. hydrophila</i>	1	0	11	4	3	6	0	0	12	10	0	30	4	1	20
<i>A. caviae</i>	4	0	7	8	0	15	1	0	15	9	0	42	2	1	2

4.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

A caracterização da espécie é efetuada adotando procedimento descrito por Janda; Abbott, 2010, a partir da semeadura em Agar GSP, subsequente triagem em Kligler Iron Agar e Agar Lisina Ferro e utilização de diferentes substratos para identificação da espécie (figura 1).

As cepas utilizadas no presente estudo estavam mantidas em Agar Nutriente tamponado a temperatura ambiente. Este meio de cultura permite armazenamento e viabilidade das mesmas por longos períodos.

A primeira etapa foi representada pela confirmação quanto a caracterização da espécie e avaliação referente as possíveis variações no metabolismo bacteriano. Para tal foi adotado como procedimento a semeadura no meio líquido Água Peptonada Alcalina (APA) acrescido de 1% NaCl e incubação a 35-37°C/18-24h. Após esse período, foi realizado o isolamento em “Glutamate Starch Phenol Red Agar” – Agar GSP (Merck), também com incubação a 35-37°C/18-24 h.

Cada cepa foi semeada paralelamente nos meios de triagem: Agar de Kligler com Ferro – KIA (Oxoid) e Agar Lisina-Ferro – LIA (Oxoid) e Agar Nutriente 0,5% NaCl (DIFCO), os quais foram incubados nas mesmas condições (37°C/18-24 h).

O Agar KIA é composto por sulfato ferroso, glicose e lactose, entre outros componentes e tem como indicador de pH, o vermelho de fenol. Seu uso é recomendado na identificação de bacilos entéricos Gram-negativos podendo ser observada na base do tubo, área de baixo potencial redox, a fermentação de glicose e lactose, evidenciada pela viragem do indicador vermelho de fenol e produção de sulfeto de hidrogênio. Bactérias não fermentadoras não irão produzir ácidos quando da fermentação da glicose, sendo assim o meio permanecerá inalterado. Bactérias que fermentam glicose apresentam acidificação em profundidade, porém a reação observada no bisel (superfície inclinada) é de alcalinidade. Haverá acidificação completa permanente de todo o meio por bactérias que fermentarem glicose e lactose.

O Agar LIA é utilizado para diferenciar microrganismos com base na capacidade de descarboxilar ou desaminar a lisina bem como com capacidade de formar H₂S. Os microrganismos capazes de descarboxilar a lisina inicialmente acidificam o meio devido à fermentação da glicose, porém rapidamente reverterem a reação ácida e desencadeiam uma reação alcalina, decorrente da liberação de amina. Deste modo, aqueles capazes de desaminar a lisina produzirão um pico alcalino sobre um fundo ácido. E aqueles que produzirem H₂S enegrecerão o meio.

O Agar Nutriente é utilizado com a finalidade de realizar o teste da oxidase e o teste de sensibilidade ao agente vibriostático O/129 (2,4-diamino 6,7-diisopropyl pteridina) nas concentrações de 10µg/µL e 150 µg/µL.

O teste da oxidase é baseado na produção de uma enzima oxidase intracelular. O procedimento se realiza gotejando o reagente (≈20µL) em tira de papel filtro previamente esterilizado. Com alça bacteriológica de platina a cepa será espalhada sobre o papel impregnado com o reagente. O resultado positivo é observado pelo aparecimento de coloração roxa.

A distinção entre Aeromonadaceae os membros da família Vibrionaceae é feita através do teste de sensibilidade ao agente vibriostático O/129. Para realização do teste, é feita semeadura em Agar Mueller-Hinton e em sequência são colocados,

um disco do agente vibriostático O/129 com concentração de 10µg e um de 150µg (incubação 37°C por 24 h). As cepas de *Aeromonas* apresentam resistência às duas concentrações, indicada pela ausência do halo de inibição de crescimento em torno dos discos.

Para diferenciação das feno-espécies são avaliadas diferentes características metabólicas incluindo: fermentação: de glicose, lactose, sacarose e arabinose, produção de gás a partir da glicose, descarboxilação de lisina e ornitina, dehidrolação da arginina, hidrólise da esculina, crescimento em diferentes concentrações de NaCl e avaliação quanto a via de fermentação da glicose (Voges-Proskauer).

A fermentação dos carboidratos é avaliada a partir da semeadura das cepas em meio de cultura contendo carboidrato, água peptonada e Indicador de Andrade. No meio de glicose foi previamente inserido um tubo de Durhan para avaliação no interior do mesmo, a produção de gás CO₂ a partir da fermentação da glicose.

Os meios: Caldo Descarboxilase de Moeller com L-arginina, com L-lisina e com L-ornitina foram utilizados para detectar a produção de lisina descarboxilase (LDC), ornitina descarboxilase (ODC) e arginina dehidrolase (ADC), respectivamente. Como produto da utilização, na descarboxilação de lisina é produzida a cadaverina enquanto a putrescina é produzida devido à descarboxilação de ornitina. A arginina é primeiro hidrolizada para ornitina que é então descarboxilada para formar putrescina. A formação destas aminas aumenta o pH do meio, alterando a cor do indicador de amarela para púrpura. Se o organismo não produz a enzima apropriada, o meio continua ácido, de cor amarelo.

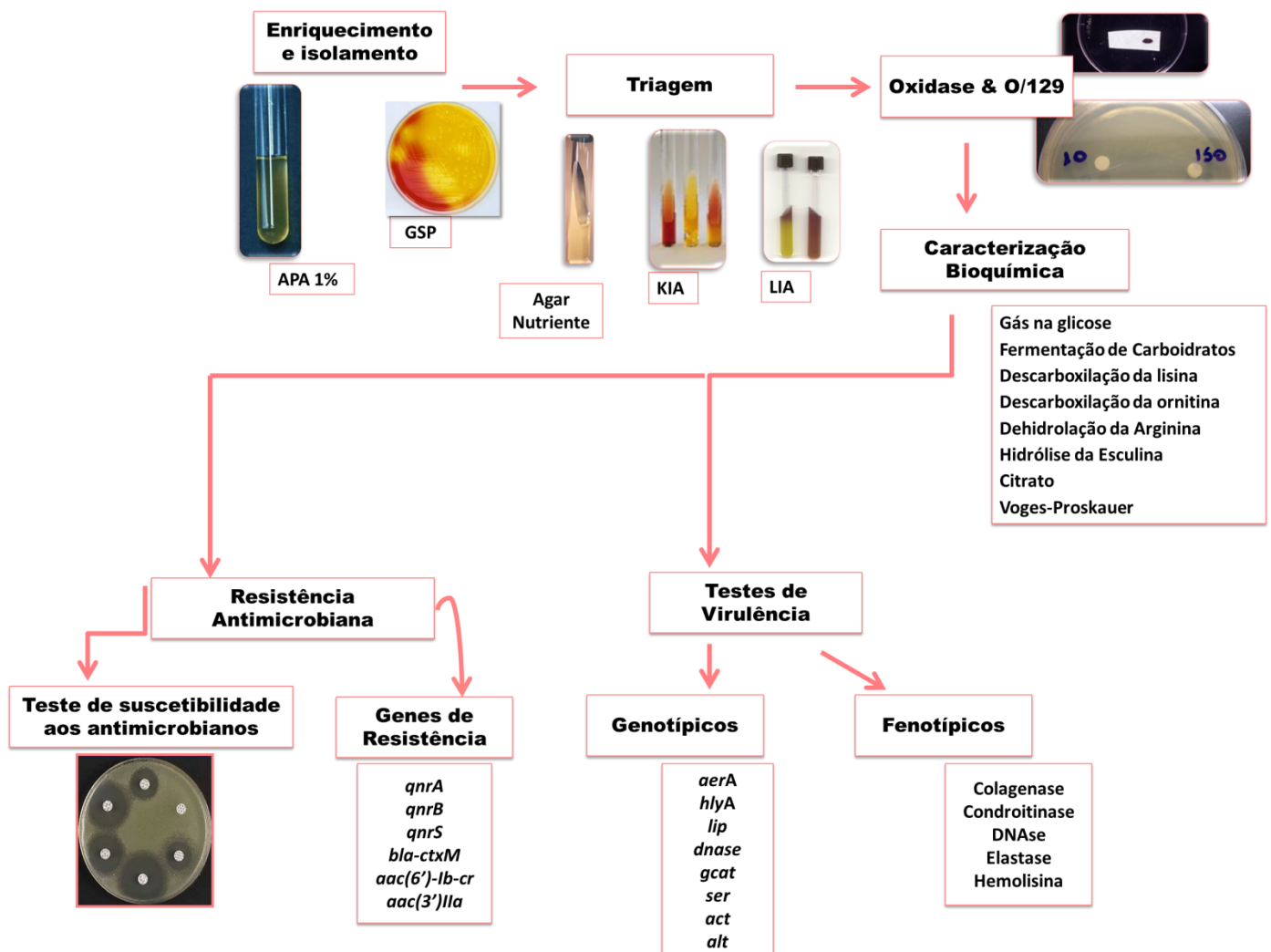
A hidrólise da esculina foi avaliada em Agar Trypticase de Soja acrescido de esculina e citrato férrico amoniacal. A esculina é um açúcar complexo, as bactérias que possuem um sistema enzimático capaz de hidrolisá-lo e assim, dão origem a esculentina a qual irá reagir com os íons de ferro dando origem a um complexo de cor escura, enegrecendo o meio. Caso a bactéria não tenha capacidade de hidrolisar a esculina o meio permanece inalterado.

A análise do crescimento bacteriano em diferentes concentrações de NaCl é realizada a partir da transferência de um inóculo utilizando agulha bacteriológica, de uma suspensão bacteriana da amostra para meio de halofilismo nas concentrações

de 0, 3, 6, 8 e 10% de NaCl com incubação a 35-37°C por 24h. O resultado positivo é observado apenas pela turvação, indicativa de crescimento em uma dada condição de salinidade.

A prova de Voges-Proskauer - VP caracteriza a via de fermentação da glicose. Este teste é caracterizado pela conversão de acetoína, composto formado por uma das vias da fermentação da glicose, em diacil. Tal reação ocorre mediante a ação do hidróxido de potássio – KOH e do oxigênio atmosférico. O caldo VP semeado é incubado por 24 horas a 35-37°C. Após o período de incubação são adicionados o catalisador α -naftol e em seguida KOH a 40%, o tubo é deixado em repouso por 10 a 15 minutos. A prova positiva é indicada pelo desenvolvimento de cor vermelha decorrente a ação do α -naftol no diacil.

Figura 2: Fluxograma do isolamento e caracterização bioquímica de *Aeromonas* spp.



4.3 DETECÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA.

4.3.1 Colagenase

A bactéria produtora da enzima colagenase é capaz de clivar o colágeno dos tecidos do hospedeiro (Thorpe & Miller, 1981). Para avaliar se a bactéria é produtora de tal enzima é feita semeadura em meio de Agar Infusão Cérebro Coração – BHI acrescido de 1% de colágeno tipo I (Sigma), também conhecido como Agar Colagenase (Furniss *et al.*, 1978). Quando utilizado pela bactéria, mediante a produção da enzima colagenase, propicia a formação de um halo transparente.

Para avaliação foi feito um inóculo bacteriano a partir de um repique inicial das cepas em estudo a partir do Agar Nutriente 0,5% NaCl para a Água Peptonada Alcalina 1% com incubação a 35-37°C/18-24 h. Deste crescimento foram retirados 10µl e depositados (semeadura em “spot”) em meio de agar colagenase com incubação a 35-37°C/4-7 dias. As cepas controle positivo e negativo empregadas no presente teste foram: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Vibrio vulnificus* ATCC 27562.

4.3.2 Elastase

A bactéria que produz a enzima Elastase é capaz de clivar a Elastina, proteína que juntamente com o colágeno é responsável pelas propriedades mecânicas do tecido conjuntivo. Sua determinação fenotípica é efetuada através da utilização do meio Agar BHI (Oxoid) acrescido de 1% de Elastina (Sigma) cuja utilização é observada através da formação de um halo transparente (Furniss *et al.*, 1978).

O procedimento para sua determinação é idêntico aquele empregado para a colagenase e condroitinase. A leitura é feita em até sete dias. Foram empregados como controle positivo e negativo as cepas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 278537 e *Vibrio vulnificus* ATCC 27562.

4.3.3 Condroitinase

A condroitina é um dos principais componentes da cartilagem. Algumas bactérias produzem a enzima condroitinase, sendo capazes de clivar a condroitina

causando danos ao tecido cartilaginoso. O meio de Agar Condroitina formulado a partir do acréscimo de 0,04% de sulfato de condroitina (Oxoid) e 1% de albumina bovina (Oxoid) em meio de Agar BHI (Furniss *et al.*, 1978). A capacidade de produção observada tomando como procedimento inicial aquele adotado para a colagenase. O tempo de incubação é de 4 a 7 dias e as cepas empregadas como controle positivo e negativo foram: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 278537 e *Vibrio vulnificus* ATCC 27562.

4.3.4 Hemolisina

A hemolisina é uma enzima capaz de provocar lise dos eritrócitos. Sua presença é avaliada através da visualização de um halo de hemólise em meio de Agar Trypticase de Soja acrescido de 5% de sangue de ovino, preparado a 45°C. Para repique das cepas, estas foram semeadas em Água Peptonada Alcalina 1% a partir da qual são retirados 10µl e semeados por “spot” no Agar Sangue com incubação a 35-37°C por 48 horas. A produção da enzima evidenciada pela formação de uma zona de hemólise total em torno da área de crescimento bacteriano. As cepas controle empregadas foram *A. hydrophila* ATCC7966 – controle positivo e *A. caviae* ATCC 15466 – controle negativo.

4.3.5 DNase

A enzima DNase tem a capacidade de promover a destruição de neutrófilos na infecção. A semelhança dos ensaios anteriores o procedimento adotado inclui um repique das cepas em estudo do Agar Nutriente para Água Peptonada Alcalina 1% incubando a 35-37°C/18-24 h. A partir do crescimento foram retirados 10µl e depositados em Agar DNase com (35-37°C/72 h) e a leitura é feita pela formação de um halo transparente em torno da área de crescimento bacteriano. Como controles positivo e negativo foram usados *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, respectivamente.

4.4 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) foi realizado pelo método de difusão em disco, de acordo com o padrão proposto no CLSI 2011/ CLSI 2012 (Quadro 3).

Para o controle na qualidade foram empregadas como padrão *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Nas cepas com resistência a cefalosporinas de 3^a-4^a gerações foi utilizada associação com clavulanato e de acordo com CLSI, e para controle de qualidade os padrões *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *E. coli* ATCC 25922.

Quadro 3: Drogas empregadas no TSA

Classe	Agente Antimicrobiano	Sigla	Ação
Cefens	Ceftazidime Cefotaxima	CAZ CTX	Inibem a síntese da parede celular das bactérias. Essa interferência leva a formação de uma parede celular defeituosa, com instabilidade de permeabilidade provocando a morte da bactéria por lise. Também pode interferir na ativação do sistema autolítico endógeno da bactéria.
Carbapenêmicos	Imipenem	IPM	
Aminoglicosídeos	Amikacina Gentamicina	AMK GEN	Penetram a parede celular e a membrana, ligando-se a subunidade ribossômica 30S, provocando erro na leitura de RNA mensageiro provocando morte da bactéria. Provoca um efeito bactericida, atuam normalmente sobre os bacilos Gram-negativos.
Tetraciclina	Tetraciclina	TCY	Bacteriostático de amplo espectro que atua por inibição da síntese das proteínas. A união reversível se produz na subunidade ribossômica 30S dos microrganismos sensíveis.
Quinolonas	Ácido nalidixico	NAL	Possuem ação bactericida ao interferir na síntese de DNA bacteriano, inibindo a DNA-girase enzima bacteriana responsável pela replicação.
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	CIP	
Inibidores da via metabólica do folato	Sulfametoxazol-trimetoprim	SXT	A sulfonamida é antagonista competitivo do PABA, impedindo a utilização do ácido fólico pela bactéria. O trimetoprim possui efeito sinérgico com a sulfonamida, os dois juntos impedem a síntese de tetraidrofolato através da inibição da diidrofolato redutase Lipossolúvel difunde-se através da membrana celular bacteriana e se une de forma reversível à subunidade
Fenicois	Cloranfenicol	CHL	50S dos ribossomos bacterianos, onde evita a transferência de aminoácidos às cadeias peptídicas em formação.
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	NIT	Age inibindo a síntese de várias proteínas e em nível ribossômico.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA.

Através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) será efetuada a pesquisa dos genes da Hemolisina (*aer A* e *hlyA*), da citotoxina (*act*), da enterotoxina citotônica termolábil (*alt*), das lipases (*lip* e *gcat* - glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase), da serino protease (*ser*) e do gene da DNase (*exu*) na totalidade das cepas.

Para obtenção do DNA purificado foi utilizado o Kit comercial: DNA Dnaeasy Tissue – Qiagen. Os iniciadores utilizados encontram-se descritos no quadro 4. Os amplicons gerados foram submetidos a corrida eletroforética utilizando Agarose, for routine use (Sigma) a 2% segundo Sen & Rodgers (2004) e com tampão de corrida TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X, com a separação por eletroforese a 90V/1:00h, coloração com BrEt, visualização em Image Quant e digitalização das imagens.

Quadro 4: Sequência dos iniciadores, condições de amplificação e tamanhos de produtos para os genes de virulência de *Aeromonas* spp.

Gene	Sequência	Condições de PCR	Amplicon
aerA¹	F 5'-CCTATGGCCTGAGCGAGAAG-3'	95°C 3' – 1X	431bp
	R 5'-CCAGTTCCAGTCCCACCACT-3'	94°C 1'/56°C 1'/72°C 1'- 35x 70°C 5' – 1X	
lip¹	F 5'-CA(C/T)CTGGT(T/G)CCGCTCAAG -3'	95°C 3' – 1X	247bp
	R 5'-GT(A/G)CCGAACCAGTCGGAGAA -3'	94°C 1'/56°C 1'/72°C 1'- 35x 72°C 5' – 1X	
gcat¹	F 5'-CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG -3'	95°C 3' – 1X	237bp
	R 5'-GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT -3'	94°C 1'/56°C 1'/72°C 1'- 35x 72°C 5' – 1X	
ser¹	F 5'-CACCGAAGTATTGGGTCAGG -3'	95°C 3' – 1X	350bp
	R 5'-GGCTCATGCGTAACTCTGGT -3'	94°C 1'/60°C 1'/72°C 1'- 35x 72°C 5' – 1X	
exu¹	F 5'-(A/G)GACATGCACAACCTCTTCC -3'	95°C 3' – 1X	323bp
	R5'-GATTGGTATTGCC(C/T)TGCAA(C/G)-3	94°C 1'/54°C 1'/72°C 1'- 25x 72°C 5' – 1X	
hlyA²	F 5'-GGCCGGTGGCCCGAAGATACGGG -3'	94°C 30''/62°C 30''/72°C 2'-35x	597bp
	R 5'-GGCGGCGCCGGACGAGACGGG -3'	72°C 1' – 1X	
act³	F 5'-AGAAGGTGACCACCAAGAACA -3'	95°C 3' – 1X	232bp
	R 5'-AACTGACATCGGCCTTGA ACTC -3'	95°C 25''/55°C 30''/72°C 1'- 25x 70°C 5' – 1X	
alt³	F 5'-TGACCCAGTCCTGGCACGGC -3'	95°C 3' – 1X	442bp
	R 5'-GGTGATCGATCACCACCAGC -3'	95°C 25''/55°C 30''/72°C 1'- 25x 70°C 5' – 1X	

1- Chacón *et al.*, 2003; 2- Heuzenroeder *et al.*, 1999; 3- Sen; Rodgers, 2004

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

As cepas que apresentaram resistência aos antimicrobianos foram submetidos a PCR para pesquisa dos genes *qnr* (resistência a quinolonas), *bla*_{-ctxM} (resistência a β-lactâmicos), integron *aac(6')-Ib* (resistência a aminoglicosídeos e quinolonas) e *aac(3')IIa* (resistência a aminoglicosídeos) descritos no quadro 5. As condições de extração do DNA, corrida eletroforética e visualização do produto são as mesmas descritas no item 4.5.

Quadro 5: Iniciadores para pesquisa de genes relacionados ao perfil fenotípico de resistência antimicrobiana de *Aeromonas* spp.

Gene	Sequência	Condições de PCR	Amplicon
<i>qnrA</i> ¹	5'-ATTTCTCACGCCAGGATTTG-3' 5'-GATCGGCAAAGGTTAGGTCA-3'	94°C 45"/53°C 45"/72°C 60" – 32x	516pb
<i>qnrB</i> ¹	5'-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG-3' 5'-ACGATGCCTGGTAGTTGTCC-3'	94°C 45"/53°C 45"/72°C 60" – 32x	469pb
<i>qnrS</i> ¹	5'-ACGACATTCGTCAACTGCAA-3' 5'-TAAATTGGCACCCCTGTAGGC-3'	94°C 45"/53°C 45"/72°C 60" – 32x	417pb
<i>bla</i> _{-ctxM} ²	5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC-3' 5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG-3'	94°C – 6' 92°C 1'/55°C 1'/72°C 1' – 30x 72° - 7'	593pb
<i>aac(6')-Ib-cr</i> ³	5'-TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA-3' 5'-CTCGAATGCCTGGCGTGTTT-3'	94°C 45"/ 55°C 45"/ 72°C 45" – 34x	482pb
<i>aac(3')IIa</i> ⁴	5'-CGCTAAACTCCGTTACC-3' 5'-TAGCACTGAGCAAAGCC-3'	96°C 30"/ 55°C 1'/ 70°C 3' – 1x 96°C 15"/ 55°C 30"/ 70°C 3' – 25x 70°C – 5'	250pb

1- Robicsek *et al.*, 2006; 2- Pitout *et al.*, 2007; 3- Park *et al.*, 2006; 4- Diaz *et al.*, 2004

5. RESULTADOS

Foram avaliadas 120 cepas de *A. caviae* e *A. hydrophila* oriundas de diferentes fontes da cadeia alimentar (humana, ambiental e animal) isoladas no período de janeiro/2008 a agosto/2012, cuja distribuição encontra-se assinalada na tabela 1.

Tabela 1: Distribuição das cepas de *Aeromonas* spp. de acordo com ano, espécie e origem.

Ano	<i>A. caviae</i>				<i>A. hydrophila</i>				Total
	HU		AN	AB	HU		AN	AB	
	EX	IN		EX	IN				
2008	0	4	2	0	0	1	1	0	8
2009	1	7	7	0	1	3	1	3	23
2010	0	1	2	0	0	0	7	0	10
2011	2	6	22	0	3	8	25	0	66
2012	0	2	0	1	1	3	5	1	13
Total	23	33	1	20	39	4	120		

*: **HU:** humana; **AB:** ambiental; **AN:** animal; **EX:** extra intestinal; **IN:** intestinal

As cepas de origem humana pertencentes às fenoepécies *A. caviae* e *A. hydrophila*, de acordo com a informação dos remetentes, foram isoladas de fezes (emissão espontânea ou swab retal) e secreções. Particularmente em *A. hydrophila*, entre as cepas de origem humana, de fonte extra intestinal foram incluídas: além das origens acima especificadas são acrescentadas as fontes: pele (1 – ano 2009), sangue (1 – ano 2011), líquido sinovial (1- ano 2012) e pulmão (1 – ano 2011). Os isolados de origem animal incluem aves, peixes, bovinos, baleias, golfinhos e toninha. Entre as ambientais encontram-se isolados de águas de rio das regiões nordeste (PE - 2012) e sul (PR - 2009).

Todas as cepas avaliadas confirmaram as características do gênero incluindo o tipo de crescimento em Agar GSP, colônias amilase positivas de cor amarela, com halo amarelo e 2-3 cm de diâmetro; teste da oxidase positivo e teste da sensibilidade

ao agente vibriostático O/129 apresentando resistência nas concentrações de 10 e 150µg. Os perfis bioquímicos apresentados se coadunaram com aqueles descritos na literatura (Janda; Abbott, 2010).

A avaliação através de métodos fenotípicos mostrou no computo geral que 93,3% apresentou positividade a pelo menos um dos diferentes ensaios. Entretanto na avaliação quanto a presença de genes responsáveis pela virulência, a totalidade das cepas apresentou pelo menos um gene. A distribuição dos fatores de virulência encontrados em cada espécie pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2: Distribuição dos fatores de virulência detectados em testes fenotípicos e genotípicos.

Fenoespécie	Total	Testes fenotípicos*					Testes genotípicos						
		Hem	DNase	Col	Ela	<i>aerA</i>	<i>hlyA</i>	<i>lip</i>	<i>gcat</i>	<i>ser</i>	<i>act</i>	<i>alt</i>	<i>exu</i>
<i>A. caviae</i>	57	31	52	2	5	18	22	11	31	3	3	6	54
<i>A. hydrophila</i>	63	44	60	14	7	31	24	37	14	9	29	15	63
Total	120	75	112	16	13	49	46	48	42	12	32	21	117

*Hem: hemolisina; Col: colagenase; Ela: Elastase

Quando os resultados são avaliados individualmente, a atividade hemolítica em ágar sangue foi observada em 62,5% cepas e a presença dos genes de hemolisina (*hlyA*) em 38,3% e aerolisina (*aerA*) entre 40,8% das cepas, observado nas figuras 3 e 4. O gene *act* (Figura 5) indicativo de atividade citotóxica da enterotoxina e associado à capacidade hemolítica foi positivo em 26,6%. Entre as cepas positivas no teste fenotípico de hemólise de sangue de ovino, 10 foram negativas para os genes envolvidos na atividade hemolítica (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição dos perfis associados à capacidade hemolítica em *Aeromonas* spp. de acordo com as diferentes fontes de isolamento.

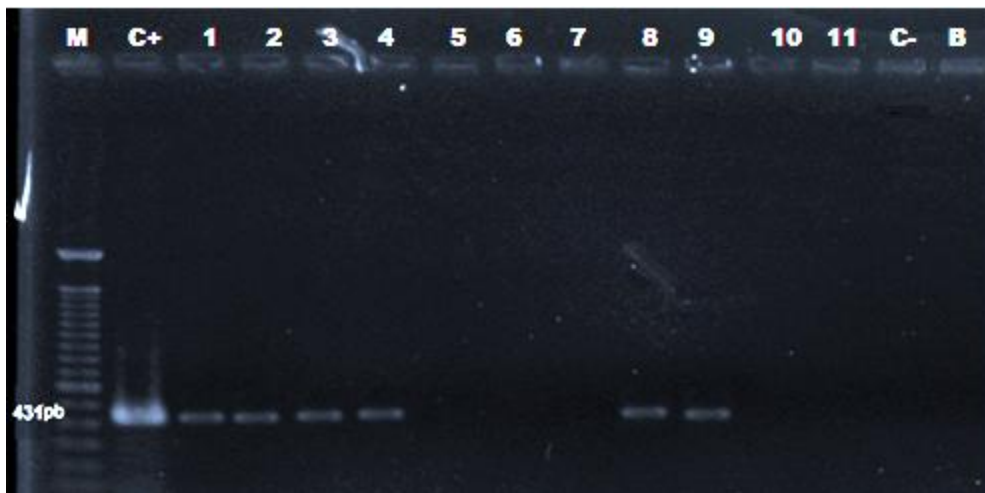
Perfis	<i>Aeromonas caviae</i>			<i>Aeromonas hydrophila</i>		
	Humana	Animal	Ambiental	Humana	Animal	Ambiental
<i>act</i> , <i>aerA</i> , <i>hlyA</i> , Hem	1	-	-	2	11	-
<i>act</i> , <i>aerA</i> , Hem	1	-	-	1	11	-
<i>act</i> , <i>hlyA</i>	-	-	-	-	1	-
<i>act</i> , Hem	-	-	-	-	2	-
<i>act</i>	-	1	-	-	1	-
<i>aerA</i> , <i>hlyA</i> , Hem	-	-	-	6	-	-
<i>aerA</i> , Hem	6	3	-	-	-	-
<i>aerA</i> ,	6	1	-	-	-	-
<i>hlyA</i> , Hem	1	14	1	2	-	1
<i>hlyA</i>	1	4	-	-	-	-
Hem	4	-	-	4	1	1

Figura 3: Caracterização do gene de virulência *hlyA* por PCR (597pb)



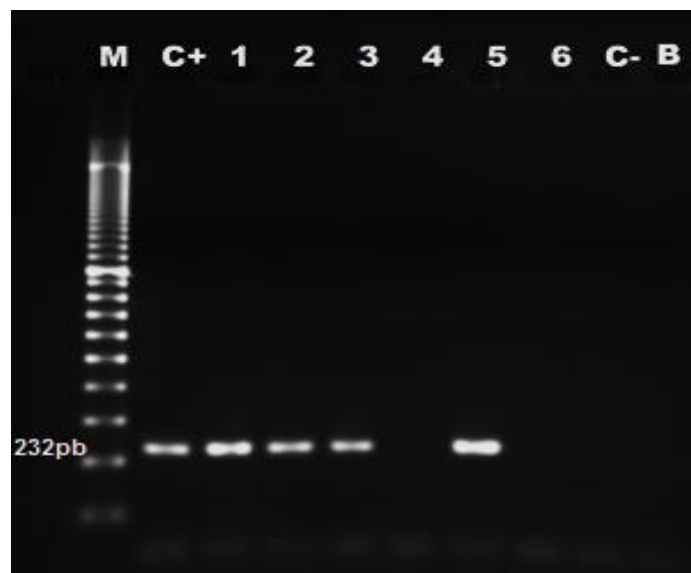
M- Marcador de peso molecular; C+ Controle positivo *A. hydrophila* ATCC 7966; **Positiva** Origem humana: *A. hydrophila*- 1, 2, 9; *A. caviae*- 8; Origem ambiental: *A. caviae*- 11; **Negativa:** Origem animal: *A. hydrophila*- 3, 4, 5, 6, 7; Origem humana: *A. caviae*- 10; C- Controle negativo – *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; B- branco.

Figura 4: Caracterização do gene de virulência *aerA* por PCR (431pb)



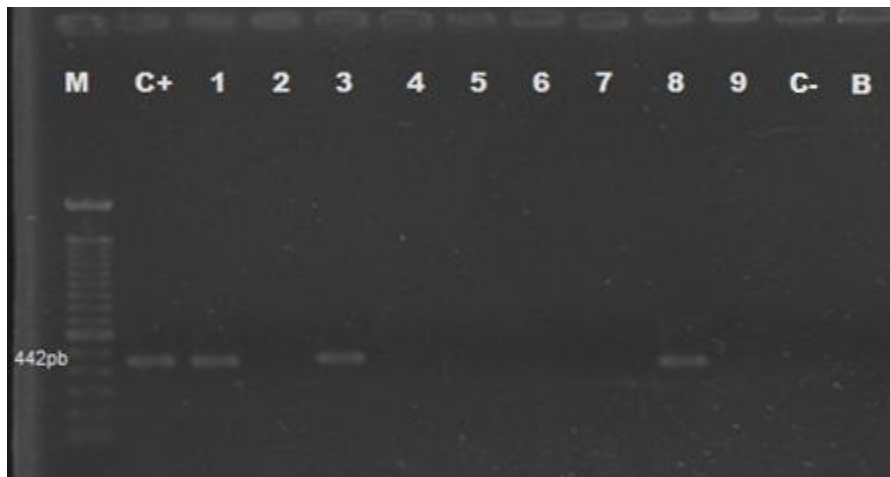
M- Marcador de peso molecular; C+ Controle positivo *A. hydrophila* ATCC 7966; **Positiva** Origem humana: *A. hydrophila*- 1, 2, 9; *A. caviae*- 8; Origem animal: *A. hydrophila*- 3, 4; **Negativa:** Origem animal: *A. hydrophila*- 5, 6, 7; Origem humana: *A. caviae*- 10; Origem ambiental: *A. caviae*- 11; C- Controle negativo – *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; B- branco.

Figura 5: Caracterização por PCR do Gene de Virulência *act* (232pb)



M- Marcador de peso molecular; C+: Controle positivo *A. hydrophila* ATCC7966; **Positiva** Origem animal: *A. hydrophila*-1,2; *A. caviae*- 3; Origem humana: *A. caviae*- 5; **Negativa:** Origem humana: *A. hydrophila*- 4; Origem ambiental: *A. caviae*- 6. C- Controle negativo – *A. caviae* ATCC 15468; B- branco.

Figura 6: Caracterização por PCR do gene de virulência *alt* (442pb)



M- Marcador de peso molecular; C+ Controle positivo *A. hydrophila* ATCC 7966; **Positiva** Origem humana: *A. hydrophila*- 1; *A. caviae*- 8; Origem animal: *A. hydrophila*- 3; **Negativa:** Origem humana: *A. hydrophila*- 2,9; Origem animal: *A. hydrophila*- 4,5, 6, 7; C- Controle negativo – *A. caviae* ATCC 15468; B- branco.

Para o gene *alt* (figura 6) enterotoxina citotônica termo-lábil, a positividade foi observada em 17,5% das cepas. Foi possível observar a presença dos genes codificadores de enterotoxinas *act* e *alt* no total de 46 isolados. A comparação entre o aparecimento desses genes isolados ou combinados pode ser observada no gráfico abaixo.

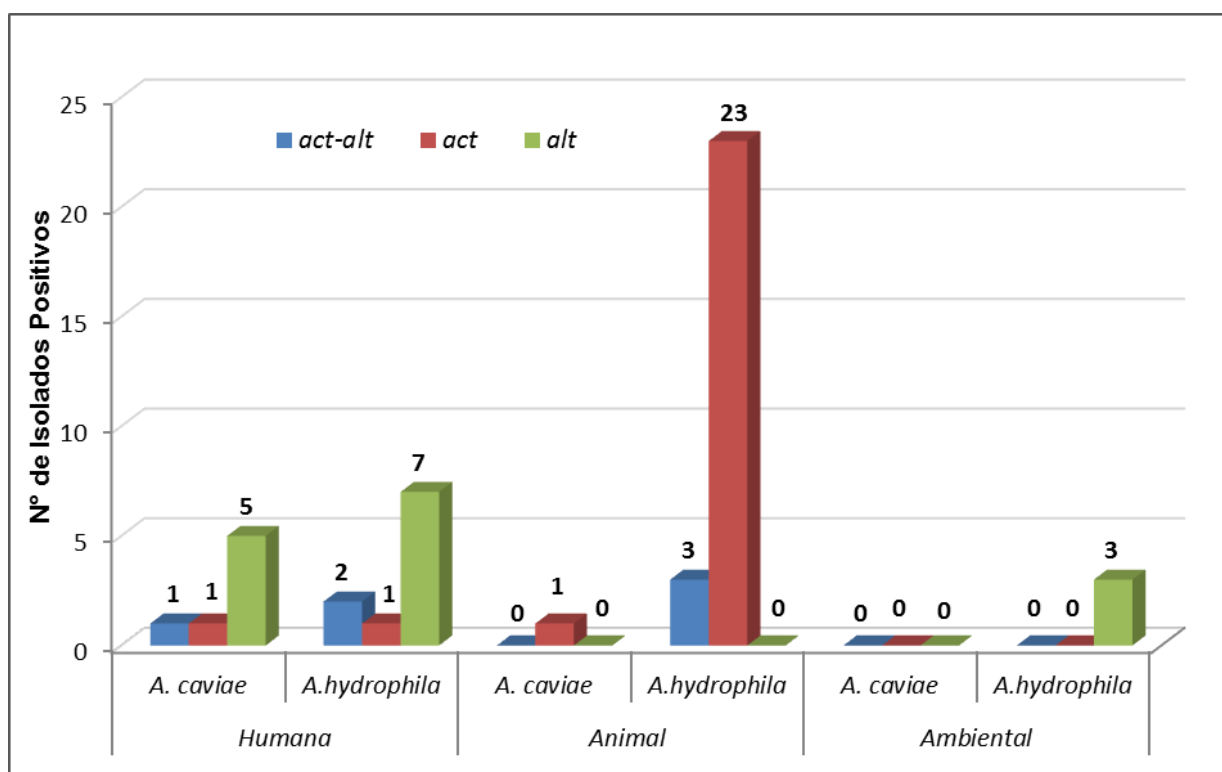
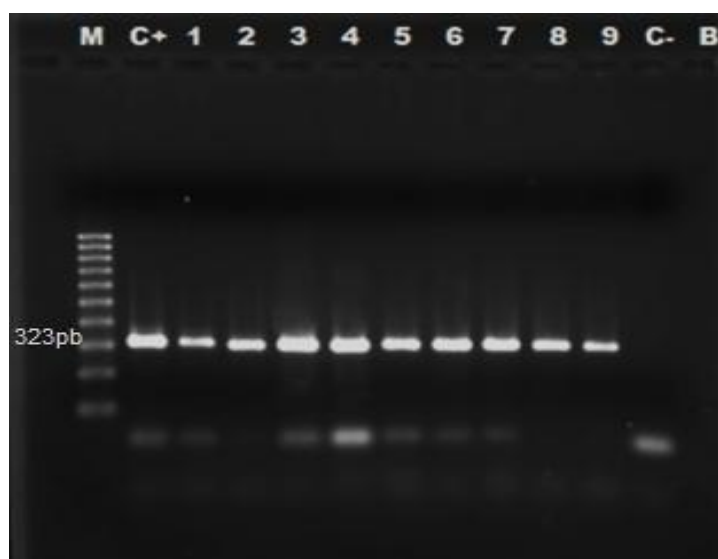


Gráfico 1: Prevalência dos genes *act* e *alt* detectados em *Aeromonas* sp. através da PCR nas diferentes fontes

A capacidade de despolimerização do DNA determinada pela enzima identificada como DNase foi constatada em 112 cepas (93,3%) através do teste fenotípico. Na avaliação quanto à presença do gene *exu* (figura 7) que codifica uma nuclease, através da técnica da PCR a totalidade das cepas foi positiva.

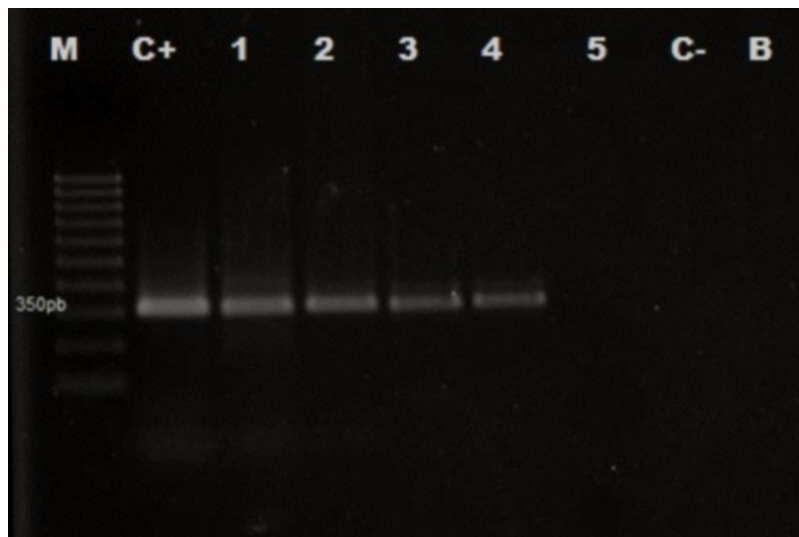
A presença do gene *ser* (figura 8) foi observada em 10% dos isolados. Os genes *lip* (figura 9) e *gcat* (figura 10) também se mostraram positivos, tendo sido o primeiro em 43 (35,8%) e o segundo em 45(37,5%) cepas.

Figura 7: Caracterização por PCR do Gene de Virulência *exu* (323pb)



M- Marcador de peso molecular; C+ Controle positivo *A. hydrophila* ATCC 7966; **Positiva** Origem humana: *A. hydrophila*- 1, 2, 9; *A. caviae*- 8; Origem animal: *A. hydrophila*- 3, 4, 5, 6, 7; C- Controle negativo – *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; B- branco.

Figura 8: Caracterização por PCR do Gene de Virulência *ser* (350pb)



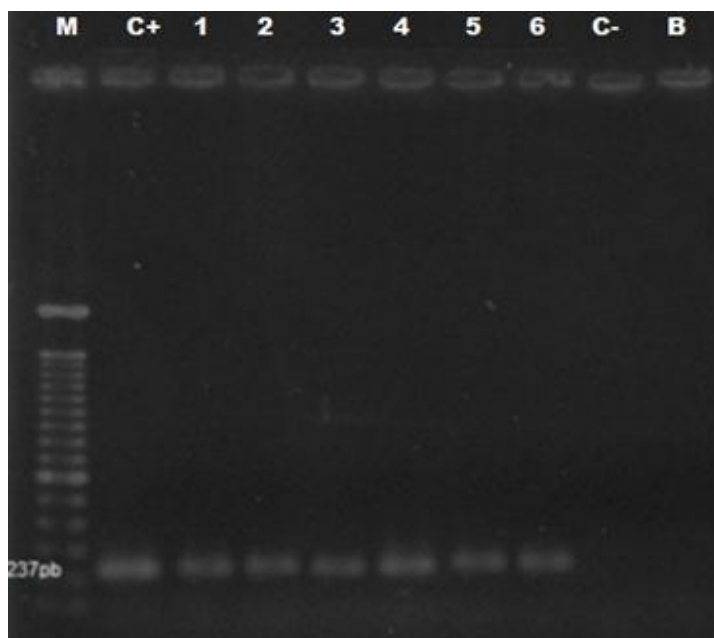
M- Marcador de peso molecular; C+ Controle positivo *A. caviae* ATCC 15468; **Positiva** Origem humana: *A. hydrophila*- 1, 2; *A. caviae*- 3; Origem animal: *A. hydrophila*- 4; **Negativa:** Origem animal: *A. hydrophila*- 5; C- Controle negativo – *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; B- branco.

Figura 9: Caracterização por PCR do Gene de Virulência *lip* (247pb)



M- Marcador de peso molecular; C+ Controle positivo *A. hydrophila* ATCC 7966; **Positiva** Origem animal: *A. hydrophila*- 3, 4, 6, 7; Origem humana: *A. caviae*- 8, 10; *A. hydrophila*- 9; Origem ambiental: *A. caviae*- 11; **Negativa**: Origem humana: *A. hydrophila*- 1, 2; Origem animal: *A. hydrophila*- 5; C- Controle negativo – *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; B- branco.

Figura 10: Caracterização por PCR do Gene de Virulência *gcat* (237pb)



M- Marcador de peso molecular; C+ Controle positivo *A. hydrophila* ATCC 7966; **Positiva** Origem humana: *A. hydrophila*- 1,2; *A. caviae*- 3; Origem animal: *A. hydrophila*- 4, 5; Origem ambiental: *A. caviae*- 6; C- Controle negativo – *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; B- branco

Os testes fenotípicos para avaliação da atividade enzimática da collagenase foi observada em 16 (13,3%) e da elastase, em 13 (10,8%) cepas. Quanto à condroitinase não foi observado resultado positivo em nenhum dos isolados.

Considerando unicamente os resultados obtidos nos testes fenotípicos foi possível estabelecer 9 perfis fenotípicos de virulência (gráfico 2).

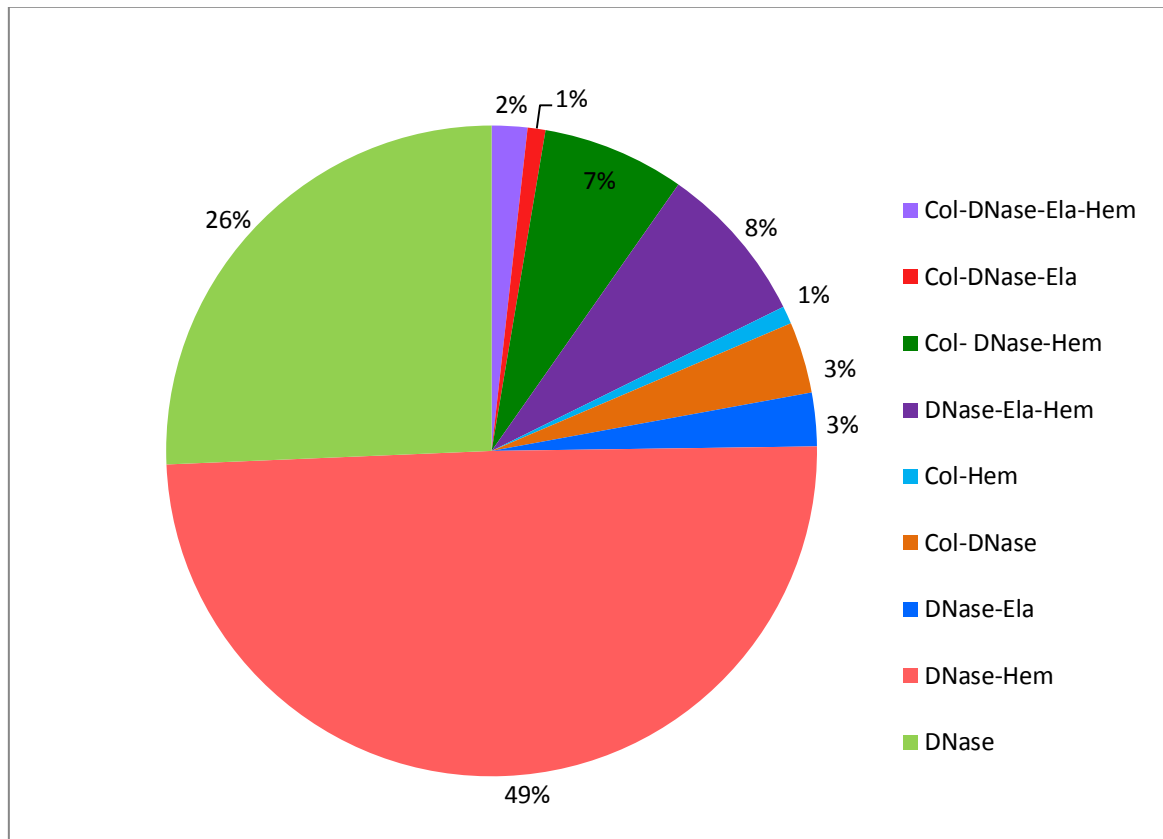


Gráfico 2: Distribuição dos perfis fenotípicos de virulência em *A. hydrophila* e *A. caviae*

As amostras de origem humana podem ser separadas em dois grupos: isolados intestinais e extra intestinais. O primeiro composto por 35 cepas de fezes/swab retal e o segundo por oito de líquido sinovial, pele, pulmão, sangue e secreções.

Entre as de origem intestinal foram detectados 21 (60%) perfis de virulência e seis (75%) entre as extraintestinais. Excetuando o gene *exu* e a DNase, positivos em todos os isolados, os marcadores que apareceram com maior frequência entre as cepas de origem humana foram: Hem, *aerA* e *alt* (gráfico 3).

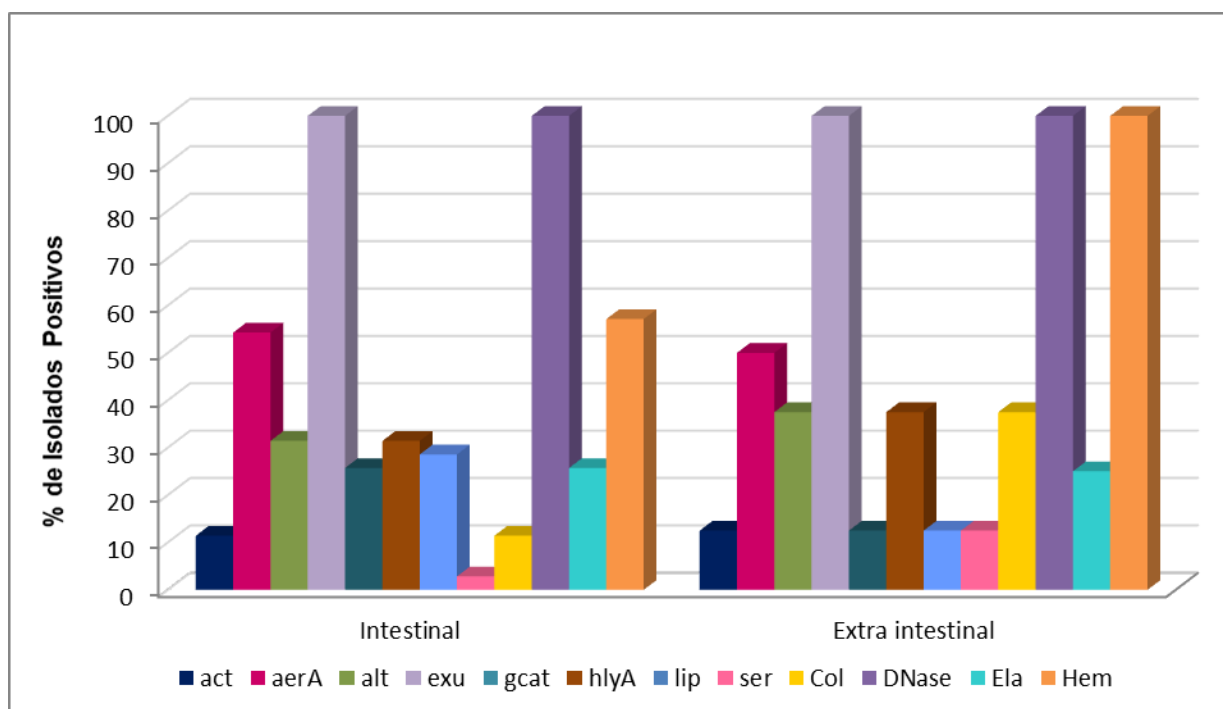


Gráfico 3: Frequência dos marcadores de virulência em *Aeromonas* spp. isolados de fonte humana de origem intestinal e extra intestinal

Entre os isolados de origem animal foram encontrados cinco oriundos de aves, 1 de bovino, 3 de peixes, 14 de lobo-marinho (*Arctocephalus* spp.), 19 de golfinhos entre as espécies: golfinho-comum (*Delphinus* sp.), golfinho-de-Fraser (*Lagenodelphis hosei*), golfinho-listrado (*Stenella coeruleoalba*) e toninha (*Pontoporia blainvillei*), e 30 de baleias das espécies: cachalote-anão (*Kogia sima*), jubarte (*Megaptera novaeangliae*) e franca do sul (*Eubalaena australis*).

O isolado de origem bovina é *A. hydrophila* cujo perfil de virulência é: *act-exu-lip-ser-DNase*. Os três isolados oriundos de peixe – 2 bagres (*Genidens genidens*) e 1 Tilápia (*Oreochromis niloticus*) foram coletados na região sudeste no estado do Rio de Janeiro e apresentaram o mesmo perfil de virulência: *exu-Col-DNase*.

Já os isolados oriundos de ave, apresentaram 4 perfis de virulência distintos, e resultados negativos para o gene *hlyA* e a enzima elastase.

Nos isolados de mamíferos marinhos foi possível detectar 18 perfis de virulência e ressaltando a elevada frequência dos marcadores: Hem, *aerA* e *act* entre as oriundas de baleias e golfinhos e *gcat* em lobo-marinho e baleia. Os isolados de lobo-marinho apresentaram, de maneira geral, menor frequência de aparecimento de virulência (gráfico 4).

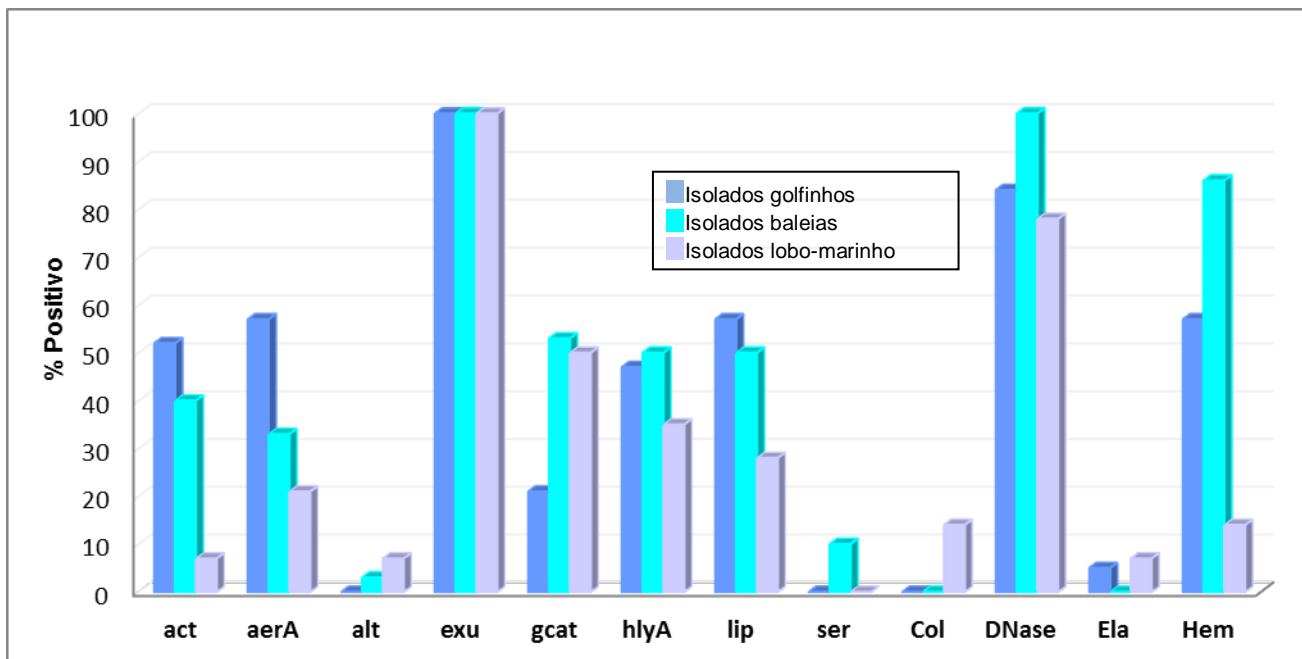


Gráfico 4: Marcadores de virulência prevalentes em *Aeromonas* spp. isolados de mamíferos marinhos

Considerando os isolados de origem ambiental foram encontrados os marcadores *alt*, *exu*, *gcat*, *hlyA*, *lip*, *ser*, Col, DNase e Hem em diferentes combinações originando 4 perfis de virulência (tabela 4).

Tabela 4: Perfis de virulência identificados em *Aeromonas* spp. de origem ambiental

	UF	Ano de isolamento	Virulência	
			Fenotípico	Genes
<i>A. hydrophila</i>	PR	2009	<i>alt, exu</i>	Col, DNase, Hem
<i>A. hydrophila</i>	PR	2009	<i>alt, exu, gcat, hlyA, lip, ser</i>	DNase, hem
<i>A. caviae</i>	PE	2012	<i>exu</i>	Col, DNase, Hem
<i>A. hydrophila</i>	PE	2012	<i>exu, gcat, hlyA, lip, ser</i>	DNase, Hem

PR: Paraná; PE: Pernambuco.

Analisando os resultados em função da região de origem dos isolados, foi possível observar que das 120 cepas estudadas, 5 pertenciam a região Nordeste (3 do Maranhão e 2 de Pernambuco), 1 a Nordeste (Roraima), 3 a Centro-oeste (Distrito Federal), 78 a Sudeste (5 do Espírito Santo, 10 de Minas Gerais e 63 do Rio de Janeiro) e 33 a Sul (24 do Paraná e 9 do Rio Grande do Sul).

O isolado da região nordeste foi uma cepa de *A. caviae* de origem humana oriunda de fezes, com sensibilidade a todos os antimicrobianos testados, cujo perfil de virulência apresentado foi: *aerA*, *exu*, *lip*, *ser*, DNase, Hem.

Entre as cepas de origem ambiental, 2 foram isoladas na região Nordeste e 3 na região Sul. Os isolados ambientais da região nordeste apresentaram maior número de marcadores de virulência. Os perfis encontrados nessas cepas de origem ambiental compreendem todos os fatores de virulência das cepas de origem humana encontradas na mesma região (quadro 6). Entre os isolados da região sul os perfis de origem humana apresentaram maior quantidade de marcadores de virulência (quadro 7).

Quadro 6: Comparação entre os perfis de virulência em *Aeromonas* spp. de origem humana e ambiental isoladas na região Nordeste do Brasil

Origem Humana	Origem Ambiental
<i>alt, exu, col, DNase</i>	<i>alt, exu, gcat, hlyA, lip, ser, DNase, Hem</i>
<i>alt, exu, DNase, Hem</i>	
<i>alt, exu, gcat, DNase</i>	<i>exu, gcat, hlyA, lip, ser, DNase, Hem</i>

Quadro 7: Perfis de virulência em *Aeromonas* spp. de origem humana e ambiental isoladas na região Sul do Brasil

Origem Humana	Origem Ambiental	
<i>act, aerA, alt, exu, gcat, hlyA, lip, DNase, Hem</i>	<i>alt, exu, col, DNase, Hem</i>	
<i>aerA, alt, exu, DNase</i>		
<i>aerA, exu, DNase, Ela</i>		
<i>aerA, exu, gcat, hlyA, lip, DNase, Hem</i>		
<i>aerA, exu, hlyA, lip, DNase, Ela, Hem</i>		
<i>exu, DNase</i>		
<i>exu, DNase, Hem</i>		
<i>exu, hlyA, DNase</i>		
<i>exu, hlyA, lip, DNase, Ela, Hem</i>		
<i>act, aerA, exu, lip, ser, DNase, Hem</i>		<i>exu, col, DNase, Hem</i>
<i>aerA, exu, DNase, Hem</i>		
<i>exu, col, DNase, Hem</i>		
<i>exu, DNase, Ela, Hem</i>		

Analisando individualmente as cepas, foi possível observar 51 perfis de virulência. Entre as duas espécies de *Aeromonas*, diferentes combinações dos fatores de virulência foram encontradas, sendo apenas três comuns as duas espécies. A distribuição dos mesmos permitiu observar a prevalência de: *exu, gcat, hlyA, DNase, Hem* em 14 cepas; *act, aerA, exu, lip, DNase, Hem* em nove cepas e *act, aerA, exu, hlyA, lip, DNase, Hem* em oito cepas, todas de origem animal. Particularmente entre as de origem humana, diferentes perfis foram observados, conforme resultados distribuídos nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Distribuição perfis de virulência observados em *Aeromonas caviae* a partir das diferentes fontes de isolamento

Perfil	Fonte de isolamento										
	Humana			Animal							Meio Ambiente
	Fezes	Sangue	Secreção	Arctocephalus australis	Arctocephalus gazella	Delphinus sp.	Eubalaena australis	Lagenodelphis hosei	Megaptera novaeangliae	Pontoporia blainvillei	
<i>act, aerA, alt, exu, gcat, hlyA, lip, DNase, Hem</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>act, aerA, exu, lip, ser, DNase, Hem</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>act, exu, gcat, DNase</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>aerA, alt, exu, DNase</i>	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aerA, alt, exu, gcat, DNase, Ela, Hem</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aerA, exu, Col, DNase, Ela</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>aerA, exu, Col, Hem</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>aerA, exu, DNase, Ela</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aerA, exu, DNase, Hem</i>	-	-	2	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>aerA, exu, gcat, lip, DNase, Ela, Hem</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>aerA, exu, lip, ser, DNase, Hem</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>exu</i>	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-
<i>exu, DNase</i>	3	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-
<i>exu, DNase, Hem</i>	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>exu, gcat, DNase</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>exu, gcat, DNase, Ela</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>exu, gcat, hlyA, DNase</i>	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-
<i>exu, gcat, hlyA, DNase, Hem</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	13	-	-
<i>exu, gcat, hlyA, lip, ser</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>exu, gcat, lip</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>exu, gcat, lip, DNase</i>	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>exu, hlyA, DNase</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>exu, hlyA, lip, DNase, Ela, Hem</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Hem = Hemólise, Col = colagenase, Ela = Elastase

Tabela 6: Perfis de virulência de *Aeromonas hydrophila* oriunda de diferentes fontes

Perfil	Fonte de isolamento															
	Humana					Animal								Meio ambiente		
	Fezes	Líquido sinovial	Pele	Pulmão	Sangue	Secreção	Ave	Bovino	Peixe	<i>Arctocephalus gazella</i>	<i>Eubalaena australis</i>	<i>Kogia sima</i>	<i>Megaptera novaeangliae</i>		<i>Pontoporia blainvillei</i>	<i>Stenella coeruleoalba</i>
<i>act, aerA, alt, exu, gcat, hlyA, lip, DNase, Hem</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>act, aerA, alt, exu, gcat, lip, ser, DNase, Hem</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>act, aerA, alt, exu, hlyA, lip, DNase, Hem</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>act, aerA, alt, exu, hlyA, lip, ser, DNase, Hem</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>act, aerA, exu, Col, DNase, Ela, Hem</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>act, aerA, exu, gcat, ser, DNase, Hem</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>act, aerA, exu, hlyA, lip, DNase, Hem</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	7	-
<i>act, aerA, exu, lip, DNase, Hem</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	4	-	-	-	-
<i>act, exu, gcat, hlyA, lip, ser, DNase</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>act, exu, lip, DNase, Hem</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>act, exu, lip, ser, DNase</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aerA, alt, exu, gcat, hlyA, Col, DNase, Hem</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aerA, exu, gcat, hlyA, DNase, Hem</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aerA, exu, gcat, hlyA, lip, DNase, Hem</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aerA, exu, hlyA, Col, DNase, Hem</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aerA, exu, hlyA, lip, DNase, Ela, Hem</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>alt, exu, Col, DNase</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>alt, exu, Col, DNase, Hem</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>alt, exu, DNase</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>alt, exu, DNase, Hem</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>alt, exu, gcat, DNase</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>alt, exu, gcat, hlyA, lip, ser, DNase, Hem</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>alt, exu, hlyA, Col, DNase, Ela, Hem</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>alt, exu, hlyA, DNase, Hem</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>exu</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>exu, Col, DNase</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>exu, Col, DNase, Hem</i>	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>exu, DNase</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>exu, DNase, Ela, Hem</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>exu, gcat, lip, ser, DNase</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>exu, lip, DNase</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-

*Hem = Hemólise, Col = Colagenase, Ela = Elastase

Em relação ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, na totalidade de cepas avaliadas 62,5% foram sensíveis. As demais apresentaram resistência à no mínimo uma droga. Multirresistência foi observada em cinco cepas (4,2%). A totalidade das cepas apresentou sensibilidade a nitrofurantoina e a distribuição da resistência para as demais drogas foi AMK: 11,7%, NAL: 12,5%, GEN: 3,4%, SXT: 7,5%, TCY: 7,5%, CHL: 1,7%, CAZ: 2,5%, CIP: 3,4%, IPM: 2,5% e CTX: 13,5%. Foram observados 16 diferentes perfis de resistência entre as espécies conforme descrito nas tabelas 7 e 8.

Entre as 45 cepas que apresentaram resistência aos antimicrobianos, 29 pertencem a região Sudeste, 15 a Sul, 2 a Centro-oeste e 2 a Nordeste. Apesar de observar que a região Sudeste apresenta o maior número de cepas resistentes, os maiores percentuais foram observados no centro-oeste e sul, aproximadamente 66% e 45% respectivamente. Considerando a resistência aos antimicrobianos nas regiões geográficas por espécie, foi possível observar que *A. caviae* apresentaram 47,5% no Sudeste e 53,3% na região Sul, não tendo sido observada resistência no Norte e Nordeste. Por outro lado, as cepas de *A. hydrophila* apresentaram percentuais de resistência em todas as regiões em que houveram isolados: 50% no Nordeste, 66,7% no Centro-oeste, 26,3 no Sudeste e 38,9% no Sul (gráfico 5).

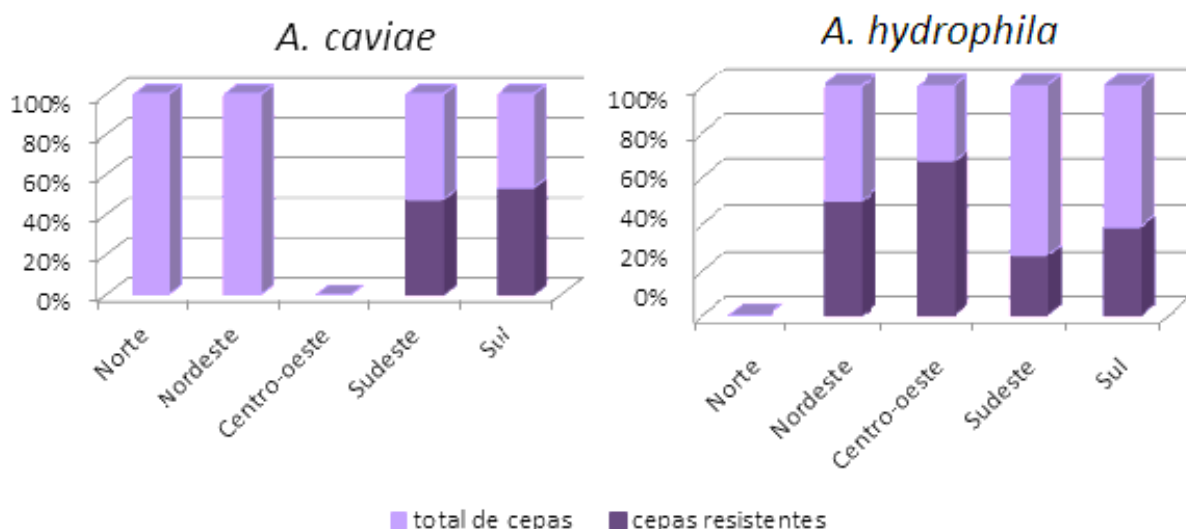


Gráfico 5: Distribuição da resistência antimicrobiana em *Aeromonas* spp. por região geográfica

Tabela 7: Distribuição dos perfis de resistência em *Aeromonas hydrophila* por fonte de isolamento.

Perfil de resistência	<i>Aeromonas hydrophila</i>									
	Humana					Animal				Ambiental
	Fezes humanas	Líquido sinovial	Pulmão	Sangue	Secreção	Ave	<i>Eubalaena australis</i>	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Tilápia	
AMK CIP CTX GEN NAL SXT TCY	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMK CTX GEN NAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
AMK CTX GEN NAL TCY	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CAZ CIP CTX NAL SXT TCY	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
CAZ CTX IPM NAL TCY	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
CIP NAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
CTX	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTX IPM	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
NAL	1	-	-	1	1	4	-	-	-	-
SXT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
TCY	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-

Tabela 8: Distribuição dos perfis de resistência em *Aeromonas caviae* por fonte de isolamento.

Perfil de resistência	Aeromonas caviae						
	Humana		Animal				
	Fezes humanas	Secreção	Arctocephalus australis	Eubalaena australis	Lagenodelphis hosei	Megaptera novaeangliae	Pontoporia blainvillei
AMK	-	-	-	-	-	10	-
AMK CAZ CTX GEN	-	-	2	-	-	-	-
AMK CTX GEN SXT	-	-	1	-	-	-	-
CHL CTX NAL	1	-	-	-	-	-	-
CHL TCY	-	-	-	-	-	-	1
CIP SXT	1	-	-	-	-	-	-
CTX	1	-	-	-	-	-	-
CTX NAL	1	1	-	-	-	-	-
CTX SXT	1	-	-	-	-	-	-
NAL	-	-	-	-	1	-	-
NAL SXT TCY	1	1	-	-	-	-	-
SXT	2	-	-	-	-	-	-
TCY	1	-	-	1	-	-	-

Avaliando, entre as cepas, os percentuais de resistência às diferentes classes de antimicrobianos em cada região geográfica, diferentes padrões foram observados, destacando-se aos Cefens nas regiões Nordeste e Centro-oeste (Gráfico 6 e Gráfico 7).

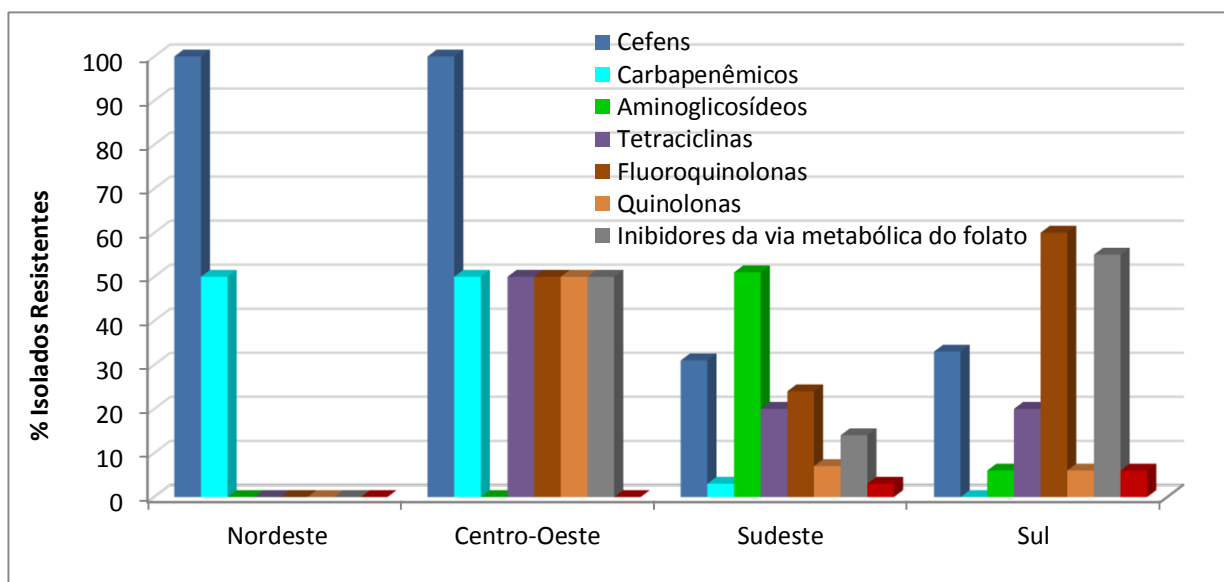


Gráfico 6: Resistência a diferentes classes de drogas nas regiões geográficas

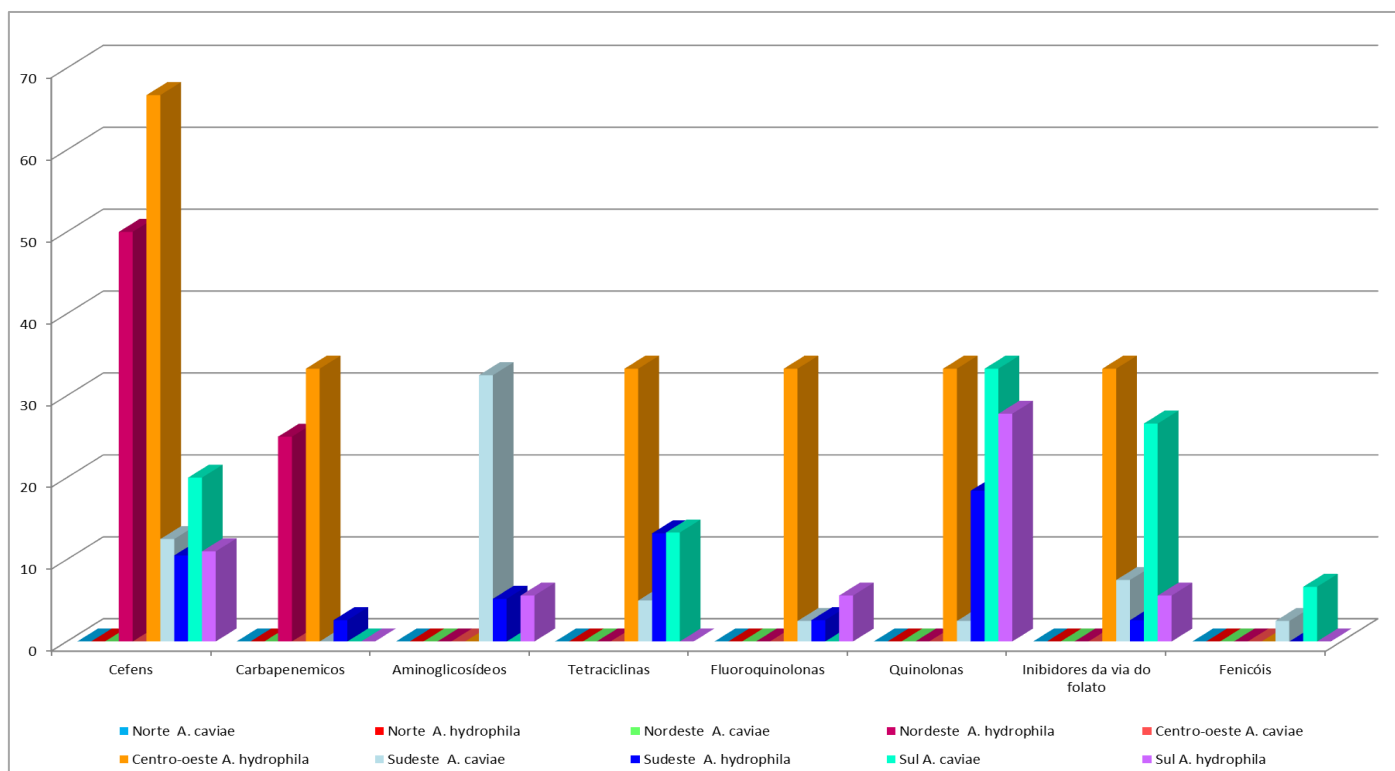


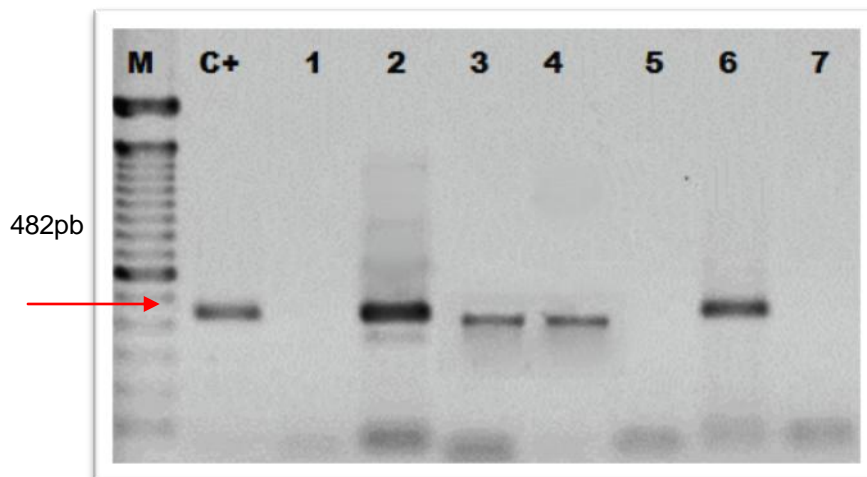
Gráfico 7: Percentuais de resistência às classes de drogas antimicrobianas por espécie nas diferentes regiões geográficas

Entre as cepas estudadas, 16 apresentaram resistência às quinolonas e fluoroquinolonas, ácido nalidixico (NAL) e ciprofloxacina (CIP) e 14 aos aminoglicosídeos amicacina (AMK) e gentamicina (GEN).

A totalidade foi avaliada quanto à presença de genes de resistência antimicrobiana através da PCR. Nenhum dos isolados apresentou resultado positivo quanto à pesquisa dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*. e *bla_{-ctxM}*

A presença do gene *aac(6')-Ib-cr* (figura 10) relacionado a resistência as quinolonas e aminoglicosídeos foi analisada inicialmente nos isolados resistentes a essas drogas e posteriormente nos demais, tendo sido reconhecido em 21,4% das cepas resistentes.

Figura 11: Caracterização de *aac(6')-Ib-cr* em *Aeromonas hydrophila* (482pb)



M- Marcador de peso molecular; C+ Controle positivo *E. coli aac(6')-Ib-cr*; **Positiva:** Origem ambiental- 2; Origem humana: 3, 4; Origem animal: 6; **Negativa:** Origem ambiental: 1; Origem animal: 5; B- branco

Seguindo o mesmo critério de avaliação, foi realizada pesquisa do gene *aac(3')IIa*, na qual foram observados apenas 3 isolados positivos.

Analisando os perfis de virulência e resistência individualmente, foi possível perceber que as cepas que apresentaram resistência a maior quantidade de drogas antimicrobianas possuíam perfis de baixa virulência, com 2 a 3 marcadores. Por outro lado, naquelas onde o perfil apresentou >7 marcadores, estas se mostraram em sua maioria sensíveis aos antimicrobianos. Na tabela 9 podemos observar, de uma forma reduzida, a comparação entre os perfis de virulência e resistência.

Tabela 9: Comparação entre os perfis de resistência antimicrobiana e virulência em *Aeromonas* spp. de variadas fontes.

Perfil de resistência	Perfil de virulência	Espécie	Fonte
AMK NAL GEN TCY CTX	DNase, <i>alt</i>	<i>A. hydrophila</i>	HU
AMK NAL GEN SXT TCY CIP CTX	DNase, Col	<i>A. hydrophila</i>	HU
AMK NAL GEN CTX	DNase, <i>alt</i> , Col	<i>A. hydrophila</i>	AB
NAL TCY CAZ IPM CTX	DNase, Col	<i>A. hydrophila</i>	AN
SXT TCY CAZ CIP	<i>hlyA</i> , DNase, <i>alt</i>	<i>A. hydrophila</i>	HU
Sensível	<i>aerA</i> , <i>hlyA</i> , DNase, <i>lip</i> , <i>ser</i> , <i>act</i> , <i>alt</i> , Hem	<i>A. hydrophila</i>	AN
Sensível	<i>aerA</i> , <i>hlyA</i> , DNase, <i>lip</i> , <i>act</i> , <i>alt</i> , Hem	<i>A. hydrophila</i>	AN
Sensível	<i>aerA</i> , <i>hlyA</i> , DNase, <i>lip</i> , <i>seri</i> , <i>act</i> , Hem	<i>A. hydrophila</i>	AN
IPM CTX	<i>aerA</i> , <i>hlyA</i> , DNase, <i>gcat</i> , <i>alt</i> , Hem, Col	<i>A. hydrophila</i>	HU
NAL	<i>aerA</i> , DNase, <i>lip</i> , <i>gcat</i> , <i>seri</i> , <i>act</i> , <i>alt</i> , Hem	<i>A. hydrophila</i>	AN
Sensível	<i>aerA</i> , <i>hlyA</i> , DNase, <i>lip</i> , <i>gcat</i> , <i>act</i> , <i>alt</i> , Hem	<i>A. caviae</i>	HU
Sensível	<i>hlyA</i> , DNase, <i>lip</i> , <i>gcat</i> , <i>seri</i> , <i>alt</i> , Hem	<i>A. hydrophila</i>	AB

*Hem = hemólise, Col = colagenase, Ela = Elastase

6. DISCUSSÃO

Em 1986 Cowell *et al.* propuseram a criação da Família Aeromonadaceae, pois até então as espécies do gênero faziam parte da Família Vibrionaceae, a qual possui muitas semelhanças fenotípicas com o gênero *Aeromonas*, sendo frequente a identificação de espécies como membros do gênero *Vibrio* (Abbott; Cheung; Janda, 2003; Park *et al.*, 2003).

Apesar das aeromonas terem sido identificadas há mais de 100 anos, ainda permanecem as dificuldades em diferenciar as espécies. Em estudos utilizando testes bioquímicos os resultados revelaram-se subjetivos e pouco confiáveis levando ao declínio no interesse de pesquisadores e médicos quanto ao gênero *Aeromonas* e suas espécies (Abbott; Cheung; Janda, 2003).

Várias reações bioquímicas de *Aeromonas* spp. móveis isoladas de alimentos, apresentaram resultados diferentes de acordo com a temperatura de incubação, mostrando resultados negativos à 37°C e positivos à 28° C (Palumbo *et al.* 2001).

Frequentemente são observadas infecções por *Aeromonas* em crianças pequenas e indivíduos com sistema imunológico deficiente ou com alguma doença de base. Nesse grupo de risco estão incluídos ainda indivíduos que sofrem de diabetes (Tena *et al.*, 2007), carcinoma, cirrose, disfunções hepáticas devido ao consumo excessivo de álcool, hepatite viral (GARCIA-IRURE *et al.*, 2003; Kamano *et al.*, 2003), leucemia (TSAI *et al.*, 2006), neoplasias, doenças auto-imunes (Thomsen; Kristiansen, 2001), além daqueles são tratados com drogas imunossupressoras ou estejam sob quimioterapia; (Tena *et al.*, 2007, Janda; Abbott, 1998; EPA, 2006).

A associação de *Aeromonas* spp. com doenças diarreicas tem sido descrita considerando a presença destes microrganismos como patógenos predominantes em amostras fecais e culturas puras e melhora do quadro clínico do indivíduo quando não detectados nas fezes (Kelly *et al.*, 1993; Abbott; Janda, 1998; Albert *et al.*, 2000; Hofer *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007).

Aeromonas spp. representam um risco significativo à saúde devido à capacidade de se multiplicar a 4°C, sob atmosfera controlada de estocagem e condições anaeróbias (Kirov, 1993). Estudos destacam o risco que a presença de esse microrganismo oferece em peixes (Kirov, 1993; Freitas *et al.*, 1998; Janda;

Abbott, 1998; EPA, 2006).

Devido à necessidade prática da determinação do potencial de virulência de *Aeromonas* em isolados clínicos e ambientais, muitas pesquisas têm desenvolvido métodos de PCR usando genes de virulência como biomarcadores para espécies patogênicas (Kingombe *et al.*, 1999; Albert *et al.*, 2000; Chacon *et al.*, 2003; Sen; Rodgers, 2004; Yu *et al.*, 2008).

A patogenicidade de *Aeromonas* spp. é multifatorial, incluindo mecanismos complexos e fatores de virulência variados (Aguilera-Arreola *et al.* 2005; Janda; Abbott, 2010). Ainda persistem dúvidas sobre o seu papel na etiologia de gastroenterites, considerando que tais bactérias já foram isoladas tanto de indivíduos doentes, quanto saudáveis, além de não existir um modelo animal que reproduza o processo diarreico. O papel dessas bactérias em infecções entéricas tem sido definido a partir de relatos de casos e investigações de surtos com o isolamento a partir de fezes de pacientes (Kirov, 2001) fato que, relaciona esses microrganismos à doença, porém não infere relação de causa e efeito (Altwegg; Geiss, 1989).

A capacidade de adaptação e multiplicação fora de hospedeiro humano confere a *Aeromonas* spp. a característica de microrganismo autóctone no ambiente (Imzilin *et al.*, 1998). Devido a sua ampla distribuição e diversidade em ambiente aquático e à relação como causador de doença em humanos e animais torna os microrganismos deste gênero alvo de investigação de pesquisas em todo mundo (Falcão *et al.*, 1998; Piannetti *et al.*, 2004; Ghenghesh *et al.*, 2013)

Patogenicidade é a capacidade de um agente microbiano de ocasionar danos em um hospedeiro (Oliveira, 2011) e a virulência pode ser vista como a habilidade de um microrganismo provocar doença num ponto específico.

Segundo alguns autores, a patogenicidade de *Aeromonas* spp. é multifatorial e inclui mecanismos complexos e vários fatores de virulência (Aguilera-Arreola *et al.* 2005; Janda; Abbott, 2010). Organismos desse gênero podem apresentar diferentes combinações dos fatores de virulência, os quais são capazes de provocar alterações bioquímicas e distúrbios no hospedeiro (Pemberton *et al.*, 1997; Janda; Abbott, 2010).

Em diversos estudos os fatores de virulência de *Aeromonas* spp. foram

caracterizados através de métodos clássicos de microbiologia como: detecção de citotoxicidade em células Vero e detecção de atividade Hemolítica em Agar sangue (Singh; Sanyal 1992; Falcão *et al.*, 1998; Awan *et al.*, 2006; Obi *et al.*, 2007; Razzolini *et al.*, 2008).

A enzima collagenase tem papel na patogenicidade de alguns microrganismos, observado em algumas espécies reconhecidamente patogênicas de *Aeromonas* (Han *et al.*, 2008). Esta, bem como a enzima elastase aparece relacionada com infecções de pele e tecido conjuntivo podendo comprometer cartilagens, ossos, mucosas entre outros.

A enzima condroitinase tem sido utilizada como importante ferramenta no estudo da estrutura, função e distribuição dos glicosaminoglicanos por muitos anos. Essa enzima pode ser purificada através da produção por algumas espécies bacterianas incluindo *Aeromonas* spp. com especial ênfase em *Aeromonas sobria* YH311 (Cai *et al.*, 2004).

Estudos identificaram diversos genes associados à virulência em bactérias do gênero *Aeromonas*. Entre estes se encontram genes das lipases, da enterotoxina citotônica termolábil (*alt*) e da enterotoxina citotóxica (*act*). Esta é portadora de propriedade hemolítica e contribui para o aparecimento de sintomas no hospedeiro (Heuzenroeder *et al.*, 1999; Balsalobre *et al.*, 2009).

A enterotoxina codificada pelo gene *act* está associada a diversas atividades: citotóxica, hemolítica e enterotóxica (Xu *et al.*, 1998; Chopra; Houston, 1999). A atividade Hemolítica também pode estar associada a outros genes *aerA* e *hlyA*, e é possível para as cepas possuir mais de um deles (Sen; Rodgers, 2004). A presença de genes codificadores de enterotoxinas em cepas de origem ambiental e animal aponta para a sua importância como fonte de contaminação do homem por *Aeromonas* spp. associada a infecção intestinal.

Alguns autores, inclusive, já citaram a capacidade de Hemólise como uma forma de diferenciar cepas de *A. hydrophila* e *A. caviae* (Cahill, 1990). Tal afirmação, entretanto, não se mostrou válida nesse estudo. A atividade Hemolítica em *Aeromonas* está associada ao grupo das aerolisinas/Hemolisinas que compreende diversos genes entre eles *aerA* e *hlyA* e também a enterotoxina *act* (Oliveira, 2011;

Tomás, 2012).

A presença dos genes *lip* e *gcat* em alguns isolados demonstram relação com a doença diarreica, uma vez que a enzima Glycerophospholipid-colesterol aciltransferases (GCAT) e as lipases têm sido associadas com dano intestinal e interação com leucócitos humanos, respectivamente (Guerra *et al.*, 2007).

O gene *gcat* é apontado por alguns autores como um possível marcador para o gênero *Aeromonas* uma vez que poderia ser encontrado em todas as espécies (Chacón *et al.*, 2002; Soler *et al.*, 2002). Entretanto, assim como observado nos resultados deste estudo, nos estudos de Chacón *et al.*(2003); Guerra *et al.*(2007) e Nam e Joh (2007) o gene *gcat* não está presente em todas as cepas analisadas.

Os resultados encontrados entre as cepas analisadas neste estudo indicam que *A. caviae* e *A. hydrophila* são, majoritariamente, produtoras de DNase, esse fenômeno é condizente com o observado por Chacón *et al.*(2003), o qual descreve que este tipo de enzima já havia sido descrita em outros patógenos bacterianos que afetam o homem, como *Streptococcus spp.* Na infecção a nuclease atua na degradação do material genético do hospedeiro, entretanto esta não é sua única vertente de atuação uma vez que essa enzima tem importante papel na nutrição e desenvolvimento bacteriano (Pemberton *et al.*, 1997), e o aparecimento de DNase na maioria das cepas assim como a presença do gene *exu* em todos os isolados corroboram a importância desse fator na manutenção de *Aeromonas spp.* no hospedeiro humano ou animal e também no ambiente.

A serina protease é uma exotoxina liberada por algumas estirpes de *Aeromonas* e pode estar envolvida com o choque séptico. Acredita-se que tal substância ajude na invasão do microrganismo quebrando as barreiras do hospedeiro (Pemberton *et al.*, 1997; Sederovich *et al.*, 2012).

Os fatores de virulência de uma bactéria são frequentemente associados aos danos que esta causa ao hospedeiro. Determinados estudos sugerem que algumas espécies de *Aeromonas* sintetizam mais fatores de virulência e com mais frequência, sugerindo origem clonal da virulência, desse modo, apenas alguns clones seriam responsáveis pela progressão da doença (Aguilera-Arreola *et al.*, 2007; Kozinska, 2007).

Um estudo recentemente realizado no Paraná mostrou que *Aeromonas spp.* apresentam frequência similar a de outros enteropatógenos, como *E. coli* enterotoxigênica, *Shigella* e *Campylobacter*, e são causa importante de diarreia no Estado representando 2,6% do total de casos diarreicos no Paraná (Surek *et al.*, 2010).

Considerando os dados deste estudo, entre as cepas de origem humana 81% foram isoladas a partir de sítio intestinal e apresentaram genes relacionados capacidade hemolítica, indicando esta característica como potencialmente relacionada a diarreia causada por *Aeromonas spp.* Estudos indicam que a presença dos produtos aerolisina e hemolisina, assim como as lípases, pode ser relacionada como causadora do quadro de diarreia (Pemberton *et al.*, 1997; Heuzenroeder *et al.*, 1999; Moura, 2010; Tomás, 2012).

As infecções por *Aeromonas spp.* são majoritariamente associadas a doenças de trato gastrointestinal, infecções de feridas e bacteremia (Wu *et al.*, 2007). Analisando os isolados de origem humana estudados é possível dividi-los em dois grupos: isolados de origem intestinal e extraintestinal, foi possível perceber a diversidade da frequência dos marcadores de virulência. Esse fato pode ser associado à presença de diferentes clones de *Aeromonas spp.* relacionados as diferentes formas de apresentação da doença e ao sítio de infecção (Janda; Abbott, 2010; Senderovich *et al.*, 2012).

No estabelecimento da infecção de feridas por *Aeromonas spp.* a produção de proteases microbianas capazes de degradar proteínas biológicas do soro e dos tecidos conjuntivos desempenha importante papel para ocorrência do processo (Janda; Abbott, 2010; Chao *et al.*, 2013). A identificação de uma *A. hydrophila* cuja origem é uma infecção de pele humana, com atividade enzimática de colagenase e Elastase denota a importância desses fatores de virulência neste tipo de infecção e aponta sua relevância para entrada e manutenção do microrganismo no hospedeiro.

Tena *et al.*(2007) relatam o diagnóstico de 38 casos de infecção extraintestinal por *Aeromonas spp.*entre os quais 18 eram infecção abdominal, 11 de pele e tecidos moles, 3 de trato urinário e 3 eram casos de bacteremia. Mais de 75% dessas infecções estavam associadas a quadros de imunossupressão prévia como malignidades e diabetes. Esses tipos de infecção podem ser fatais ou causar graves

sequelas debilitantes (Pund; Theegarten, 2008).

Foi possível observar no presente estudo a diversidade de marcadores de virulência apresentados pelas cepas, através dos perfis de virulência. No total formaram-se 51 perfis diferentes variando em oito marcadores e outros com apenas um. Ressalta-se que as cepas de origem humana apresentaram maior diversidade de perfis.

Realizando uma comparação entre os perfis de virulência encontrados em cepas humanas e ambientais é possível perceber que apesar de não apresentarem perfis comuns, os perfis ambientais contem marcadores de virulência distribuídos entre as cepas humanas. Na região Norte-Nordeste os isolados ambientais apresentaram perfis com maior quantidade de marcadores de virulência, entretanto todos os marcadores com exceção do gene *hlyA*, foram encontrados nos perfis de virulência dos isolados humanos desta região.

Efeito similar pôde ser observado entre os isolados humanos e ambientais da região Sul. Todos os marcadores de virulência dos isolados ambientais foram encontrados nos isolados humanos. Essa associação entre os fatores de virulência encontrados em cepas ambientais e humanas e ao mesmo tempo a ausência de perfis comuns aponta a capacidade de adaptação de *Aeromonas* spp. associada ao perfil multifatorial de virulência.

Entre os isolados de origem perfil de virulência mais comum foi *exu, gcat, hlyA, DNase, Hem* encontrado em 14 cepas de *A. caviae* isolados de *Megaptera novaeangliae* – Baleia Jubarte (13) e *Eubalena australis* – Baleia Franca do Sul (1). Destacam-se também os perfis *act, aerA, exu, lip, DNase, Hem* e *act, aerA, exu, hlyA, lip, DNase, Hem* o primeiro com 9 e o segundo com 8 exemplares. No primeiro perfil as cepas foram isoladas de *M. novaeangliae* (4) e *E. australis* (5), enquanto que no segundo os isolados eram *Stenella coeruleoalba* – Golfinho Listrado (7) e *Pontoporia blainvillei* – Toninha(1), todos foram coletados no litoral da região sul, no período de final de inverno e primavera. Esses animais migratórios costumam se reproduzir em águas tropicais. O “encalhe” pode acontecer por um erro de navegação, condições de stress, baixa imunidade, aparecimento de doenças. O

estado de saúde do animal “encalhado” pode indicar o estado da população que está no mar.

A baleia-franca-do-sul (*E. australis*) passa os meses de verão a sul, em zonas onde abunda o krill, junto à Antártica. No Inverno migram para norte, para se reproduzirem, podendo ser vistas junto às costas da Argentina, Austrália, Brasil, Chile, Moçambique, Nova Zelândia e África do Sul (Portal Baleia Franca, 2001).

A baleia-jubarte (*M. novaeangliae*) pode ser vista em todos os oceanos. É uma espécie migratória, que passa os verões nas águas frias de latitudes mais altas e que se reproduz em climas tropicais ou subtropicais. Percorrem distâncias de mais de 25.000 km ao ano, sendo recordistas entre os mamíferos (American Cetacean Society, 2013).

A toninha (*P. blainvillei*) é um pequeno cetáceo da família Pontoporiidae que pode ser encontrado nas águas costeiras do Brasil e da Argentina. Por viverem apenas na costa leste da América do Sul, entre o Espírito Santo, no Brasil, e o Golfo San Matias, na Argentina. A captura acidental em redes de pesca é a principal ameaça à conservação da toninha. Centenas morrem todos os anos ao longo do litoral, pois se emaranham nas redes e acabam se afogando (Projeto Toninha, 2013).

O golfinho-listrado (*S. coeruleoalba*) é a espécie menos conhecida do gênero no Atlântico Sul ocidental. A maioria dos registros de captura acidental ocorre em águas rasas do sul do Brasil e Argentina. Enquanto a maioria dos registros de encalhe acontece na costa nordeste, sudeste e sul do Brasil (Moreno *et al.*, 2005).

Ao observar os perfis mais frequentes de virulência é possível notar em todos eles a presença de marcadores de característica hemolítica, lipases e nucleases. Esses marcadores denotam a patogenicidade e invasividade de *Aeromonas* spp. nesses animais. Lallier e Higgins (1988) encontraram *A. hydrophila* seguida de *A. sobria* e *A. caviae* como principais etiologias em peixes e mamíferos doentes. As cepas de *A. hydrophila* isoladas eram em sua maioria produtoras de protease, Elastase, hemólise e enterotoxina em testes fenotípicos e as cepas de *A. caviae* eram produtoras de protease apenas.

Considerando a frequência dos fatores de virulência nos grupos de mamíferos

marinhos, foi possível observar maior similaridade entre os isolados de baleias e golfinhos em relação aos isolados de lobo-marinho. A provável explicação para esse fato seria a maior proximidade “grau de parentesco” entre os animais dos dois primeiros grupos e a semelhança de hábitos entre eles.

Pereira *et al.*(2008) encontraram frequência de aproximadamente 20% no isolamento de *A. hydrophila* e *A. caviae* em mamíferos marinhos da costa sul e sudeste do Brasil. A presença desses microrganismos em animais migratórios de ambiente aquático que possuem fatores de virulência também encontrados em cepas de origem humana aponta características zoonóticas em *Aeromonas* spp. e implica esses animais como possíveis fontes de infecção para o homem.

Analisando os perfis de virulência e resistência de cada cepa individualmente, foi possível perceber que as cepas que apresentaram resistência a maior quantidade de drogas antimicrobianas possuíam perfis de baixa virulência, com 2 a 3 marcadores. Enquanto que as cepas com perfil de virulência constituído de 7 a 8 marcadores, se mostraram em sua maioria sensíveis.

O gênero *Aeromonas* foi inicialmente descrito como suscetível a: tetraciclina, cloranfenicol, cefalosporinas, aminoglicosídeos e quinolonas (Moura 2010). Entretanto, essas bactérias podem apresentar resistência à ação de diversos antimicrobianos seja por carregarem genes intrínsecos ou por adquirirem marcadores de resistência advindos de outros microrganismos (Surek *et al.*, 2010). Estudos indicam que *Aeromonas* spp. são capazes de adquirir resistência durante o tratamento, como, por exemplo, pode acontecer com a tetraciclina utilizada no tratamento de infecções bacterianas em peixes (Ko *et al.*, 1998; Agerso *et al.*, 2007).

Em geral os isolados clínicos de *Aeromonas* são suscetíveis a aminoglicosídeos, carbapenemas, cefalosporinas, macrolídeos, nitrofuranos, penicilinas de espectro estendido, quinolonas e tetraciclinas. Entretanto em nosso estudo, de um total de 43 cepas de origem humana, 22 cepas apresentaram resistência a no mínimo um antimicrobiano.

Comparando os dados encontrados com o resultado descrito por Aravena-Román *et al.*(2011) utilizando 26 agentes antimicrobianos e espécies de *Aeromonas* de origem clínica e ambiental, foi possível observar que o percentual de cepas *A. caviae* e *A. hydrophila* resistentes foi distinto. No artigo foram encontrados 2,1%

entre *A. caviae* e 61,7% em *A. hydrophila*, enquanto que neste estudo os percentuais foram 54% e 32,2% respectivamente. Essa discrepância quanto aos percentuais de resistência pode ser devido à diferença de fármacos antimicrobianos utilizados e principalmente devido a circulação de clones diferenciados nas regiões de origem dos isolados estudados.

O percentual de resistência ao imipenem encontrado foi 2,5% indicando 97,5% de sensibilidade, consoante ao obtido por Aravena-Román *et al.*(2012) que encontraram 100% de cepas sensíveis aos carbapens. De acordo com Janda; Abbott (2010) a sensibilidade de *Aeromonas* spp. aos carbapenemas encontra-se entre 90 e 100%.

Evangelista-Barreto *et al.*(2010) caracterizaram diferentes espécies de *Aeromonas* isoladas de água do rio Cocó no Ceará, entre seus resultados podemos perceber que apesar de 60% das cepas apresentarem resistência a pelo menos um fármaco antimicrobiano, não foram isoladas cepas multirresistentes.

O aumento da resistência aos antibióticos em espécies de *Aeromonas* a partir de diferentes origens tem sido relatado, mostrando o aparecimento não só em cepas de origem clínica como de outras fontes de isolamento tais como peixe, alimentos e águas naturais (Alcaide *et al.*, 2009; Roseli, 2011).

As bactérias do gênero *Aeromonas* possuem sua capacidade de expressar β -lactamases induzíveis na presença de antimicrobianos β -lactâmicos entre eles penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas (Janda; Abbott, 2010). Esses antimicrobianos inibem a síntese da parede celular bacteriana causando instabilidade de permeabilidade, levando a lise da célula bacteriana.

As β -lactamases induzíveis cromossomais são reconhecidas como maior mecanismo de resistência aos antimicrobianos em *Aeromonas* spp. (Ko *et al.*, 1998). Essas enzimas são amplamente distribuídas entre microrganismos do gênero *Aeromonas*, com destaque para as de classe C, pois conferem resistência a cefalosporinas especialmente a cefoxitina (Moura, 2010). Considerando esse fato, o percentual de resistência a cefoxitina encontrado neste estudo poderia ser justificado pela provável ação da enzima.

A enzima *ctx-M* é uma β -lactamase de espectro estendido que confere resistência a penicilinas, cefalosporinas de 1^a, 2^a e 3^a geração e aztreonam (Moura, 2010). Essa ESBL mediada por plasmídeo já foi identificada na Europa, no Japão e na América do Sul. Há relatos da identificação desse tipo de enzima em *A. hydrophila* de origem ambiental (Luca *et al.*, 2010). Assim como observado por Balsalobre *et al.*(2010), nenhuma das cepas apresentou o gene que codifica a enzima. Indicando que nas amostras estudadas a resistência a ceftazidime e cefotaxime pode ser mediada mecanismos de origem cromossomal.

As quinolonas são antibióticos sintéticos usados como drogas de escolha para o tratamento de infecções por *Aeromonas* em seres humanos (Jones; Wilcox, 1995; Alcaide *et al.*, 2009). Estas drogas podem persistir por um longo tempo no ambiente, o que poderia favorecer o surgimento de cepas resistentes em amostras ambientais. Resistência às quinolonas em bactérias Gram-negativas é principalmente devido a mutações cromossômicas que alteram as enzimas alvo para estas drogas: DNA girase e topoisomerase IV (Moura, 2010). Estas são heterotetrâmeros formados por dois tipos de subunidades: *gyrA*, *gyrB* e *parC*, *parE*, respectivamente.

A resistência às quinolonas é tradicionalmente mediada por mutações cromossômicas nos genes da topoisomerase bacteriana e genes que regulam a expressão de bombas de efluxo (Park *et al.*, 2006). Mutações nas regiões determinantes de resistência a quinolona dos genes *gyrA* e *parE* estariam relacionadas a resistência a quinolonas em espécies de *Aeromonas* móveis. A resistência às quinolonas exibida pelas estirpes de *Aeromonas* pode ser mediada através de outros mecanismos conhecidos em bactérias Gram-negativas como a presença do gene *qnr* ou ainda por aumento do efluxo do antimicrobiano por bombeamento ativo.

A resistência as quinolonas também tem sido reportada em *Aeromonas*. Aproximadamente 12,5% das cepas estudadas foram resistentes ao ácido nalidixico e 3,3% à ciprofloxacina. Sinha *et al.*(2004) reportaram altos índices de resistência intrínseca ao ácido nalidixico e a ciprofloxacina. A resistência a essas drogas pode ser relacionada aos genes *gyr* de origem cromossomal e *qnr* de origem plasmidial.

Os aminoglicosídeos são agentes antimicrobianos utilizados primariamente no tratamento de infecções por bacilos Gram-negativos aeróbios. São internalizados pela bactéria e então interagem com seu metabolismo. A resistência a aminoglicosídeos ocorre devido a diversos mecanismos que podem coexistir simultaneamente na mesma célula. Um desses mecanismos é a presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (Ramirez; Tolmasky, 2010).

As aminoglicosídeo-N-acetiltransferases (AACs) promovem a acetilação do grupamento NH₂ do antimicrobiano em diversas posições. A subclasse AAC(3), codificada pelo gene *aac(3)*, tem sido descrita em bactérias Gram-negativas e confere resistência a gentamicina, sisomicina e fortimicina. A subclasse AAC(6') é mais comum, distribuída entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. AAC(6)-Ib pode ser considerada a subclasse de maior relevância clínica pois confere resistência a amicacina e outros aminoglicosídeos e é encontrada em diversos Gram-negativos inclusive em *Acinetobacter* sp., *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Vibrionaceae* (Ramirez; Tolmasky, 2010).

Foi possível observar entre as amostras testadas para o gene *aac(6')-Ib-cr* amostras positivas que eram resistentes a aminoglicosídeos e a quinolonas. A enzima aminoglicosídeo acetiltransferase possui duas substituições específicas de aminoácidos que permitem a acetilação de ciprofloxacina e norfloxacina (Picão *et al.*, 2008).

7. CONCLUSÕES

- A seleção de cepas de origem humana, animal e de meio ambiente permitiu a observação de diferentes combinações de fatores de virulência, confirmando o perfil multifatorial de virulência em *Aeromonas* spp.
- Por meio da caracterização fenotípica da virulência foi possível ressaltar a prevalência do marcador DNase.
- A determinação de genes de virulência em conjunto com os marcadores fenotípicos de virulência permitiu uma visualização ampla de perfis de virulência.
- A diversidade nos perfis de virulência das cepas e a relação entre os marcadores de virulência indicam que estes variam de acordo com as necessidades para sua sobrevivência em determinado ambiente.
- A caracterização fenotípica da resistência a drogas antimicrobianas evidenciou resistência a diversas drogas e inclusive a presença de bactérias com perfil de multirresistência.
- Ao caracterizar os genes de resistência antimicrobiana a drogas de última geração não foram observados altos índices de positividade, representando um indício que os perfis de resistência fenotípicos observados estariam relacionados a outros genes ou a condições de resistência intrínseca e cromossomal.
- Conhecendo a ampla distribuição de *Aeromonas* spp. e seu potencial patógeno e até mesmo considerando a característica de microrganismos desse gênero atuarem como reservatórios de genes de resistência aos antimicrobianos, seu monitoramento se torna cada vez mais relevante.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott S. L., Cheung, W. K. W., Janda, J. M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n.6, p.2348-2357, 2003.

Agarwal S., Gopal K., Upadhyaya T., Dixit A. Biochemical and functional characterization of UDP-galactose 4-epimerase from *Aeromonas hydrophila* *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1774; p. 828-837, 2007.

Agerso Y, Bruun MS, Dalsgaard IE, Larsen JL. The tetracycline resistance gene *tet(E)* is frequently occurring and present on large horizontally transferable plasmids in *Aeromonas* spp. From fish farms. *Aquaculture*, v. 266, p. 47-52, 2007.

Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. *Aeromonas*: Human Health Criteria Document. Washington, 2006

Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez C, Zúñiga G, Figueras MJ, Castro-Escarpulli G. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. *FEMS Microbiology Letters*, v. 242(2), p.231-40, 2005.

Aguilera-Arreola M. G., Hernández-Rodríguez C., Zúñiga G., Figueras M. J., Garduño R. A., Castro-Escarpulli G. Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: a comparative study. *Canadian Journal of Microbiology* v. 53, n. 7, p. 877-887, 2007.

Al-Benwan, K., Abbott, S.; Janda, J.M.; Huys, G.; Albert, M.J. Cystitis Caused by *Aeromonas caviae* Journal of Clinical Microbiology. v. 45, n. 7, p.2348-2350, 2007.

Albert, M. J, Ansaruzzaman, M., Talukder, K. A., Chopra, A. K., Kuhn, I., Rahman, M., Faruque, A. S., Islam, M. S., Sack, R. B., Mollby, R. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. Journal of Clinical Microbiology, v.38(10), p.3785-90, 2000.

Alcaide, E., Blasco, M. D., Esteve, C. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from human, water and eels. Research in Microbiology, v. 161, p. 40-45, 2009.

Alperi A., Martínez-Murcia A. J., Ko W. C., Monera A., Saavedra M. J., Figueras M. J. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarelli* sp. nov., two new clinical species from Taiwan. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 60, p. 2048-55, Epub 2009.

Alperi A., Martínez-Murcia A. J., Monera A., Saavedra M. J., Figueras M. J. *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a Spanish river. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 60, p. 72-7, 2010.

Altwegg M, Geiss HK. *Aeromonas* as a human pathogen. Critical Review in Microbiology, v. 16, p. 253–86, 1989.

Altwegg, M, Martinetti L. G., Lüthy-Hottenstein J., Rohrbach M.. *Aeromonas*-associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, v. 10, p. 44-45, 1991.

American Cetacean Society. Humpback Whale. San Pedro, Los Angeles, CA, EUA. Disponível em: <http://acsonline.org/fact-sheets/humpback-whale/>. Acessado em: Agosto de 2013.

Aoki, T., Satoh, T., Kitao, T. New tetracycline resistance determinant on R plasmids from *Vibrio anguillarum*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 31, n. 9, p. 1446–1449, 1987.

Aravena-Román, M., Inglis T. J. J., Henderson, B., Rilley, T. V., Chang, B. J. Antimicrobial Susceptibilities of *Aeromonas* Strains Isolated from Clinical and Environmental Sources to 26 Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 56, n. 2, p. 1110, 2012.

Asao, T., Kinoshita, Y., Kozaki, S., Uemura, T. and Sakaguchi, G., “Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin,” *Infection and Immunity*, v. 46, n. 1, p. 122–127, 1984.

Awan, M. B., Ahmed, M. M., Bari, A., Krovacek, K. Putative virulence factors of the *Aeromonas* spp. Isolated from food and environment in Abu Dhabi United Arab mirates. *Journal of Food Protection*, v.69, p. 1713-1716, 2006.

Balassiano, I. T., Basto, M. C. F., Madureira, D. J., Silva I. G., Freitas-Almeida, Oliveira, S. S. The involmment of *tetA* and *tetE* tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 7, p. 861-866, 2007.

Ballal, M., Rajeswari, Bindu, A. M., Shivananda, C. Correlation of the suicide phenomenon in *Aeromonas* species with virulence and enteropathogenicity. *Indian*

Journal of Pathology and Microbiology, Chandigarh, v. 44, p. 421-425, 2001.

Balsalobre, L. C., Dropa, M., Lincopan, N., Mamizuka, E. M., Matté, G. R., Matté, M. H. Detection of metallo- β -lactamases-encoding genes in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. Letters of Applied Microbiology, v. 49, p. 142-145, 2009a.

Balsalobre, L. C., Dropa, M., Matté, G. R., Matté, M. H. Molecular detection of enterotoxins in environmental strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. Journal of Water Health, v. 7, n. 4, p. 685-691, 2009b.

Balsalobre, L. C., Dropa, M., Oliveira, D. E., Lincopan, N., Mamizuka, E. M., Matté, G. R., Matté, M. H. Presence of *bla*TEM-116 gene in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* from Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v. 41, p. 718-719, 2010.

Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Figueras M. J., Romalde, J. L. *Aeromonas piscícola* sp. nov., isolated from diseased fish. Systematic Applied Microbiology, v. 32, p.471-479, 2009.

Borsh, E., Nesbakken, T., Christensen, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. International Journal of Food Microbiology, v. 30, p. 9-25, 1974.

Buchanan, R. L. The 'New' pathogens: An update of selected examples. Association of Food and Drug Officials, Louisville, v. 48, p. 142-155, 1984.

Cahill, M. M. Virulence factors in motile *Aeromonas* species. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 69, p. 1-16, 1990.

Cai, S. L., Yan, H. L., He, H. Z. Purification and Immobilization of Chondroitinase from *Aeromonas sobria* YH 311. *Chinese Journal of Biotechnology*, v. 04, 2004.

Carnahan, A. M., Behram, S., Joseph, S. W. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 12, p. 2843-2849, 1991.

Castro-Escarpulli G, Peña del Barrio D, Castañeda N, García Azcuaga A, Morier Dias L, Aguilera-Arreola MG, Bravo Farias L. Virulence factors of *A. caviae* strains isolated from acute diarrheic disease in Cuba. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, v. 44, n. 1, p. 11-13, 2002.

Catoir, V., Poirel, L., Aubert, C., Claude-James, S., Nordmann, P. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerging Infectious Diseases* 14(2): 231-236, 2008

Chacón, M. R., Castro-Escarpulli, G., Soler, L., Guarro, J., Figueras, M. J. A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* v. 44, n. 3, p. 221-5, 2002.

Chacón, M. R., Figueras, M. J., Castro-Escarpulli, G., Soler, L., Guarro, J. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* v. 84, p. 269-278, 2003.

Champsaur, H., Andremont, A., Mathieu, D. Cholera like illness due to *Aeromonas sobria*. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago, US: University of Chicago Press, v. 145, n. 2, p. 248-254, 1982.

Choi, J. P., Lee, S. O., Kwon, H. H., Kwak, Y. G, Choi, S. H., Lim, S. K. Clinical Significance of Spontaneous *Aeromonas* Bacterial Peritonitis in Cirrhotic Patients: A Matched Case-Control Study. *Clinical Infectious Disease*, v. 47, p. 66–72, 2008.

Chopra, A. K., Houston, C. W. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes and Infection*, v. 1, p. 1129-1137, 1999.

Chuang, Y.C. *et al.* Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. *Microbiology*, Reading, v. 143, p. 803-812, 1997.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline. M45-A2*, v. 30, n. 18, 2011, 81p.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. M100-S22*, 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23*, 2013.

Colwell, R. R., MacDonell, M. T., De Ley J. Proposal to recognize the family

Aeromonadaceae. International Journal of Systematic Bacteriology v. 36, n. 3, p. 473-477, 1986.

Demarta, A., Kupfer, M., Riegel, P., Harf-Monteil, C. Tonolla, M. Peduzzi, R., Monera, A., Saavedra, M. J., Martinez-Murcia, M. J. *Aeromonas tecta* sp. Nov., isolated from clinical and environmental sources. Systematic & Applied Microbiology, v. 31, p.278-286, 2008.

Deodhar, L. P., Saraswathi, M., Varudkar, A. *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. Journal of Clinical Microbiology, v. 29, n. 5, p. 853-856, 1991.

Diaz, P., Bello, H., Dominguez, M., Trabal, N., Mella, S., Zemelman, R., Gonzalez, G. R. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido. Revista Médica de Chile, v. 132, p. 1173-1178, 2004.

Edberg, S. C., Browne, F. A., Allen, M. J. Issues for microbial regulation: *Aeromonas* as a model. Critical Reviews in Microbiology, v. 33, p. 89-100, 2007.

Ender, P. T., Dolan, M. J., Dolan, D., Farmer., J. C., Melcher, G. P. Near-drowning associates *Aeromonas*-pneumonia. Journal of Emergency Medicine, v. 14, p.737-741, 1996.

Euzéby, J. P. Necessary corrections according to Judicial Opinions 16, 48 and 52. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998

Euzéby, J. P. *Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire: Aeromonas hydrophila*. 04 jun 2003. Disponível em: < <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/nomstaxons.html>>. Acessado em junho 2013.

Evangelista-Barreto, N. S., Vieira, R. H., Carvalho, F. C., Torres, R. C., Sant'Anna, E. S., Rodrigues, D. P., Reis, C. M. *Aeromonas* spp. isolated from oysters (*Crassostrea rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 48, n. 3, p. 129-33, 2006.

Evangelista-Barreto, N. S., Carvalho, F. C. T., Vieira, R. H. S. F., Reis, C. M. F., Macrae, A., Rodrigues, D.P. Characterization of *Aeromonas* species isolated from an estuarine environment. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 452-460, 2010.

Falcão, D. P., Lustri, W. R., Bauab, T. M. Incidence of non-01 *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* spp. in fresh water in Araraquara Brazil. *Current Microbiology*, v. 37, n. 1, p. 28-31, 1998.

Falgás, S. L. Importancia biosanitaria de *Aeromonas*: Taxonomia y Epidemiologia. Tarragona, Spain, 3 out. 2003. 326 f. Tese (Doctoral em Nutrició i Metabolisme) – Unitat de Biologia e Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina I Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, 2003. Disponível em: <http://www.tdx.cbuc.es/TESIS_URV/AVAILABLE/TDX-0326104-113325/#documents>. Acessado em: agosto de 2013

Farmer III, J.J; ARDUINO, M. J.; HICKMAN-BRENNER, S. W. The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*. ed.3, v.6, p.564-596, 2006.

Ferguson, M. R., Xu, X-J., Houston, C. W., Peterson, J. W., Coppenhaver, D. H., Popov, V. L. Hyperproduction, Purification, and Mechanism of Action of the Cytotoxic Enterotoxin Produced by *Aeromonas hydrophila*. *Infection Immunity*, v. 65, n. 10, p. 4299–4308, 1997.

Figueras, M.J. Clinical relevance of *Aeromonas*. *Reviews in Medical Microbiology*, Edinburgh, v. 16, p. 145-153, 2005.

Figueras M. J., Alperi A., Beaz-Hidalgo R., Stackebrandt E., Brambilla E., Monera A., Martínez-Murcia A. J. *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 61(Pt 2), p. 242-8, 2011. Epub Mar 5 2010.

Fosse, T. C. Giraud-Morin, C; Madinier, I. Beta-lactam-resistance phenotypes in the genus *Aeromonas*. *Pathologie et Biologie*, v. 51, p. 290-296, 2003.

Freitas, A. C., Freitas-Almeida, A. C., Nunes, M. P., Ricciardi, I. D. *Aeromonas* species isolated from human urine; biological characterization and antibiotic susceptibility. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 24, p. 203-206, 1993.

Freitas, A. C., Souza, S. M. S., Macedo, L. C., Pinto, E. C., Pereira, S. S. *Aeromonas* species associated with gastroenteritis in children: prevalence, characteristics and virulence properties. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 29, p. 152-157, 1998.

Furniss, A. L., J. V. Lee, and T. J. Donovan. The vibrios. *Public Health Laboratory Service Monogr. Ser. no. 11*. Her Majesty's Stationery Office, London. 1978.

Galindo, G. L., Sha, J.; Fadl, A. A., Pillai, L., Chopra, A. K. Host immune responses to *Aeromonas* virulence factors. *Current Immunology Reviews*, v. 2, p.13-26, 2006.

Garcia-Irure, J. J, Navascues, A., Vivanco, M., Rodrigo, A. Peritonitis bacteriana espontánea y bacteremia por *Aeromonas hydrophila*. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, v. 26, n. 3, p. 429-31, 2003.

Garcia López, M. L.; Santos, J, A.; Otero, A. Motile *Aeromonas* spp. *FoodInfo Online Features*, United King: IFIS Publishing, 15 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.foodsciencecentral.com/library.html#ifis/13366>>. Acessado em: junho de 2013.

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

Ghenghesh, K. S.; Ahmed, S.; El-Khalek, R. A.; Al-Gendy, A.; Klena, J. *Aeromonas*-Associated Infections in Developing Countries. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 2, p. 81-98, 2008.

Ghenghesh, K. S., El-Mohammady, H., Levin, S. Y., Zorgani, A. Antimicrobial resistance profile of *Aeromonas* species isolated from Libya. *Libyan Journal of Medicine*, v. 8: 21320, 2013.

Gómez-Garcés, J. L., Saéz, D., Almagro, M., Fernández-Romero, S., Merino, F., Campos, J., Oteo, J. Osteomyelitis associated to CTX-M-15-producing *Aeromonas hydrophila*: First description in the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 70, p. 420-422, 2011.

Goñi-Urriza, M., M. Capdepuy, C. Arpin, N. Raymond, P. Caumette, and C. Quentin. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, p. 125-132, 2000.

Graf J. Diverse restriction fragment length polymorphism patterns of the PCR-amplified 16S rRNA genes in *Aeromonas veronii* strains and possible misidentification of *Aeromonas* species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 3194-3197, 1999.

Guerra, I. M. F., Fadanelli, R., Figueiro, M., Schreiner, F. J., Delamare, A. P. L., Wollheim, C., Costa, S. O. P., Echeverrigaray, S. *Aeromonas* associada a doenças diarreicas no sul do Brasil: Prevalência, fatores de virulência e resistência antimicrobiana. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 638-643, 2007.

Han, H. J., Taki, T., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T. Pathogenic potential of a collagenase gene from *Aeromonas veronii*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 54, n. 1, p.1-10, 2008.

Harf-Monteil, C., Le Flèche, A., Riegel, P., Prévost, G. , Bermond, D., Grimont, P. A. D., Monteil, H. *Aeromonas simiae* sp. isolated from monkey faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 2, p. 481-485, 2004.

Hayes, S. L., Lye, D. J., McKinistry, C. A., Vesper, S. J. *Aeromonas caviae* strain induces Th1 cytokine response in mouse intestinal tract. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 56, n. 1, p. 27-31, 2010.

Heuzenroeder M. W., Wong C.Y.F., Flower R. L. P. Distribution of two Hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, v. 177, p. 131-136, 1999.

Hiransuthikul, N.; Tantisiriwat, W.; Lertutsahakul K.; Vibhagoo, A.; Boonma A, P. Skin and Soft-Tissue Infections among Tsunami Survivors in Southern Thailand. *Clinical Infectious Diseases*, v. 41, p. 93-96, 2005.

Hofer, E., Reis, C. M. F., Theophilo, G. N. D., Cavalcante, V. O., Lima, N. V., Henriques, M. F. C. M. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 2, p. 217-220, 2006.

Holt, J. G. Facultatively anaerobic Gram negative rods. In: BERGEY, D. H. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9. ed. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 816 p. group 5, subgroup 1, p. 175-289, 1994.

Horneman, A. J., Ali, A., Abbott, S. L. *Aeromonas* in Murray, P. R. *Manual of Clinical Microbiology*, 9^a ed, p. 716-722, 2007.

Igbinosa, I. H., Igumbor, E. U., Aghdasi, F. Tom. M., Okoh, A. I. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *The Scientific World Journal* v. 2012, Article ID 625023, 2012.

Imziln, B., Krovacek, K., Baloda, B .S., Kuhn, I., Rey, C. G., Svenson, S. B. Characterisation of potencial virulence markers in *Aeromonas caviae* isolated from polluted and unpolluted aquatic environments in Morocco. *FEMS Microbiological*

Ecology, v. 27, p. 153-161, 1998.

Isonhood, J. H. and Drake, M. *Aeromonas* species in foods. Journal of Food Protection, v. 65, p. 575–582, 2002.

Janda, J. M. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, syndromes associated with the genus *Aeromonas*. Clinical Microbiology Reviews, v. 4, p.397–410, 1991.

Janda, J. M.; Abbott, S. L.; Carnahan, A. M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H. Manual of Clinical Microbiology. 6. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1482 p., p. 477–482, 1995.

Janda, J. M.; Abbott, S. L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. Clinical Infectious Diseases, v. 27, p. 332- 344, 1998.

Janda, J. M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: Sussman, M. Molecular Medical Microbiology, London: Academic Press, p. 1237-1270, 2001.

Janda, J. M., and Abbott, S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. Clinical Microbiology Reviews, v. 23, p. 35–73, 2010.

Jones, B.L., Wilcox, M.H. *Aeromonas* infections and their treatment. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 35, p. 453-461, 1995.

Joseph, S. W., Carnharan, A. M. Update on the genus *Aeromonas*. ASM News, Philadelphia, v. 66, p. 218-223, 2000.

Kamano, Y., Ohashi, H., Kikuchi, T., Watanabe, K., Kitahara, M. Liver abscess and *Aeromonas* bacteremia with septic pulmonary embolism. Intern Med v. 42, n. 10, p. 1047-9, 2003.

Kelly, K. A., Koehler, J. M., Ashdown, L. R. Spectrum of extraintestinal disease due to *Aeromonas* species in tropical Queensland, Australia. Clinical Infectious Disease, v. 16, n. 4, p. 574-9, 1993.

Khajanchi, B. K., Sha, J., Kozlova, E. V., Erova, T. E., Suarez, G., Sierra, J. C., Popov, V. L., Horneman, A. J., Chopra, A. K. N-Acylhomoserine lactones involved in quorum sensing control the type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and in vivo virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. Microbiology, v. 155, p. 3518-3531, 2009.

Khajanchi, B. K., Fadi, A. A., Borchardt, M. A., Berg, R. L., Hornem, A. J., Stemper, M. E., Joseph, S. W., Moyer, N. P., Sha, J., Chopra, A. K. Distribution of virulence factor and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. Applied Environmental Microbiology, v. 76, n. 7, p. 2313-2325, 2010.

Khadori, N., Fainstein, V. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents. Annual Review Microbiology, v. 42, p. 395-419, 1988.

Kingombe, C. I. B., Huys, G., Tonolla, M., Albert, M. J., Swings, J., Peduzzi, R., Temmi, T. Pcr detection, characterization, and distribution of virulence genes in

Aeromonas spp. Applied Environmental Microbiology, v. 65, n. 12, p. 5293-5302, 1999.

Kirov, M. S. The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. International Journal of Food Microbiology, v. 20, n. 4, p. 179-198, 1993.

Kirov, M. S. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. In: Doyle, M.; Beuchat, L.; Montville, T. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Washington, US: ASM Press, p. 265–287, 1997.

Kirov, S.M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In. Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. Food Microbiology: Washington: ASM Press, p. 301-327, 2001.

Ko, W. C, Wu, H. M., Chang, T. C., Yan, J. J. Wu, J. J. Inducible β -Lactam Resistance in *Aeromonas hydrophila*: Therapeutic Challenge for Antimicrobial Therapy. Journal of Clinical Microbiology, v. 36, n. 11, p. 3118-3192, 1998.

Kozinska A. Dominant pathogenic species of mesophilic *aeromonads* isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. Journal of Fish Disease, v. 30, p. 293-301, 2007.

Krovacek, K., Faris, A., Mansson, I. Growth of and toxin production by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* at low temperatures. International Journal of Food Microbiology, v. 13, p. 165-175, 1991.

Lallier, R., Higgins, R. Biochemical and toxigenic characteristics of *Aeromonas* spp. isolated from diseased mammals, moribund and healthy fish. Veterinary

Microbiology, v. 18, n. 1, p. 63-71, 1988.

Lamy, B., Kodjo, A., the colBVH Study Group, and Laurent, F. Prospective nationwide study of *Aeromonas* infections in France. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, p. 1234-1237, 2009.

Leung, K. Y., Stevenson, R. M. Characteristics and distribution of extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of General Microbiology*, v. 134, p. 151–160, 1988.

Libisch, B., Giske C. G., Kovács B., Tóth T. G., and. Füzi M. Identification of the first IM metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain. *Journal of Clinical. Microbiology*, v. 46, p. 1878-1880, 2008.

Luca F., Giraud-Morin C., Rossolini G. M., Docquier J. D., Fosse T. Genetic and biochemical characterization of TRU-1, the endogenous class C β -lactamase from *Aeromonas enteropelagenes*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, v. 54, n. 4, p. 1547-1554, 2010.

Majeed, K.N., Mac Rae, I.C. Experimental evidence for toxin production by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* in a meat extract at low temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, v. 12, p. 181-188, 1991.

Martin-Carnahan A., Joseph SW. Aeromoadaceae. *In*: Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T.; Garrity, G. M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Proteobacteria, Part B.* v. 2, 2 ed, Springer-Verlag. New York, USA, p. 556-578, 2005.

Martinez-Murcia, A .J.; Saavedra, M. J.; Mota, V. R.; Maier T, Stackebrandt, E.; Cousin, S. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 58, p. 1169-1175, 2008.

Mary, P., Buchet, G., Defives, C., Hornez, J. P. Growth and survival of clinical vs. environmental species of *Aeromonas* in tap water. International Journal of Food Microbiology, v. 69, p. 191-198, 2001.

Merino, S., Rubires, X., Knochel, S., Tomas, J.M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. International Journal of Food Microbiology, v. 28, p. 157-168, 1995.

Merino, S.; Aguilar, A.; Noguerras, M. M.; Regue, M.; Swift, S.; Tomás, J. M. Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. Serogroup O:34. Infection and Immunity, v. 67, n. 8, p. 4008-4013, 1999.

Merino, S., Shaw, J.G., Tomás, J.M. Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, v. 263, p. 127-135, 2006.

Miñana-Galbis, D., Farfán M., Fusté, M. C. and Lorén, J. G. *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve mollusks. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 54, p. 2073-2078, 2004.

Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Lorén, J. G., Fusté, M. C. Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. Systematic Applied Microbiology, v. 33, n. 1, p.15-19, 2010.

Moreno, I. B., Zerbini, A. N., Danilewicz, D., Santos, M. C. O., Simões-Lopes, P. C., Lailson-Brito, J., Azevedo, A. F. Distribution and habitat characteristics of dolphins of the genus *Stenella* (Cetacea: Delphinidae) in the southwest Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, v. 300, p. 229–240, 2005.

Moura, E. M. M. Análise do perfil de resistência a antibióticos e detecção dos genes de virulência e resistência em *Aeromonas* provenientes de amostras ambientais. 2010. 115f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Namdari, H. and Bottone, E. S. *Aeromonas caviae*: ecologic adaptation in the intestinal tract of infants coupled to adherence and enterotoxin production as factors in enteropathogenicity. *Experientia*, v. 47, p. 434-436, 1991.

Namdari, H. and Cabelli, V.J. The suicide phenomenon in motile aeromonads. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, p. 543-547, 1989.

Neuwirth, C., Siebor, E., Robin, F., Bonnet, R. First occurrence of an IMP metallo-beta-lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. Dec;51(12):4486-8, 2007.

Neves, M. S., Nunes, M. P., Milhomer, A. M. *Aeromonas* species exhibit aggregative adherence to Hep-2 cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, p.1130-1131, 1994.

Nojimoto, I. T. I., Bezana, C. S. C., Carmo, C. Valadão, L. M., Carrijo, K. M. Prevalência de *Aeromonas* spp. em fezes diarréicas de crianças menores de 5 anos

de idade na cidade de Goiânia, Goiás, no biênio 1995-1996. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30, n. 5, p. 385-388, 1997.

O'Hara, C. M. Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST system and NID panel for identification of Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, and commonly isolated nonenteric gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 928-933, 2006.

Oliveira, D. E. Caracterização, pesquisa dos genes de virulência e beta-lactamases em *Aeromonas hydrophila* provenientes de esgoto e lodo tratados. 2011. 120f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2011.

Pablos, M., Rodrigues-Calleja, J. M., Santos, J. A., Otero, A., Garcia-Lopez, M. Occurrence of Motile *Aeromonas* in Municipal Drinking Water and Distribution of genes Encoding Virulence Factors. *International Journal of Food Microbiology*, v. 135, p.158-169, 2009.

Palumbo, S. A.; Morgan, D. R.; Buchanan, R. L. Influence of temperature, NaCl and pH on growth of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Food Science*, v. 50, n. 5, p. 1417–1421, 1985.

Palumbo, S.; Abeyta, C.; Stelma, G.; Wesley, I. W. *Aeromonas, Arcobacter, and Plesiomonas*. In: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4. ed. Washington: American Public Health Association - APHA, 2001. 676p. cap. 30, p. 283– 290. ISBN 087553-175-X.

Park, T. S., Oh, S. H., Lee, E. Y., Lee, T. K., Park, K. H., Figueras, M. J. and Chang, C. L.. Misidentification of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* as *Vibrio alginolyticus* by

the Vitek system. Letters in Applied Microbiology, v. 37, p. 349- 353, 2003.

Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. A., Sahm, D., Hooper, D. C. Prevalence in the United States of *aac(6')*-Ib-cr Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. Antimicrobial Agents Chemotherapy, v. 50, n. 11, p. 3953-3955, 2006.

Parker, J. L., Shaw J. G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. Journal Infection, v.62, n. 2, p.109-118, 2011.

Pemberton, J. M., Kidd, S. P., Schmidt, R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 152: 1-10, 1997.

Pereira, C. S., Amorim, S. D., Santos, A. F. M., Reis, C. M. F., Theophilo, G. N. D., Rodrigues, D. P. Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from newborns hospitalized at Rio de Janeiro City. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 41, p. 179-182, 2008.

Pianietti, A., Sabatini, L., Bruscolini, F., Chiaverini, F., Cecchetti, G. Faecal contamination indicators, *Salmonella*, *Vibrio* and *Aeromonas* in water used for the irrigation of agricultural products. Epidemiology Infectious, v.132, n.2, p. 231-238, 2004.

Picão, R. C., Poirel, L., Demarta, A., Petrini, O., Corvaglia, A. R., Nordmann, P. Expanded-spectrum beta-lactamase PER-1 in an environmental *Aeromonas media* isolate from Switzerland. Antimicrobial Agents Chemotherapy, v. 52, n. 9, p. 3461-3462, 2008.

Pitout, J. D. D., Hamilton, N., Church, D. L., Nordmann, P., Poirel, L. Development and clinical validation of a molecular diagnostic assay to detect CTX-M-type β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 13, n. 3, 2006.

Popoff, M. Y. Genus III. *Aeromonas*. In: BERGEY, D. H. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9 ed. v. 1, Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 1388 p., p. 545-548.

Portal Baleia Franca. Santos, Brasil, 2001. Disponível em: <http://www.baleiafranca.org.br/>. Acessado em agosto de 2013.

Projeto Toninhas. Santa Catarina, Brasil, 2013. Disponível em: <http://www.projetoninhas.org.br/>. Acessado em setembro de 2013.

Pund, R. T., Theegarten, D. The importance of aeromonads as a human pathogen. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, v. 51, n. 5, p. 569-576, 2008.

Qadri, S., M., Gorden, L. P.; Wende, R. D.; Williams, R. P. Meningitis due to *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, US: American Society for Microbiology, v. 3, n. 2, p. 102-104, 1976.

Ramirez, M. S., Tolmasky, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, v. 13, n. 6, p. 151-171, 2010.

Razzolini, M. T., Bari, M. D., Zanolli Sato, M. I., Sanchez, P. S. *Aeromonas* detection and their toxins from drinking water from reservoirs and drinking fountains. *Journal of Water Health*, v. 6, n. 1, p. 117-123, 2008.

Rahman, M., Simm, R., Kader, A., Basseres, E., Römling, U., Möllby, R. The role of c-di-GMP signaling in an *Aeromonas veronii* biovar *sobria* strain. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, v. 273, n. 2, p. 172–179, 2007.

Roseli, V. R. Avaliação de sistema de cultivo integrado a partir da reciclagem de águas residuais a tratamento primário: pesquisa de espécies dos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* e *Aeromonas*. 2011. 93f. Doutorado em Microbiologia. Centro Biomédico, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2011.

Robicsek, A., J. Strahilevitz, D. F. Sahm, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper. *Qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 50, p. 2872–2874, 2006.

Sanchez-Cespedes, J., Blasco M. D., Marti S., Alba V., Alcade E., Esteve C., and Vida J. Plasmid-mediated QnrS determinant from a clinical *Aeromonas veronii* isolate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 52, p.2990–2991, 2008.

Sen, K. and Rodgers, M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *Journal of Applied Microbiology* v. 97, p. 1077-1086, 2004.

Senderovich, Y., Ken-Dror, S., Vainblat, I., Blau, B., Izhaki, I., Helporn, M. A

Molecular Study on the Prevalence and Virulence Potential of *Aeromonas* spp. Recovered from Patients Suffering from Diarrhea in Israel. PLoS ONE, v. 7, n. 2, e30070. doi:10.1371/journal.pone.0030070, 2012.

Sha, J., Kozlova, E. V., Chopra, A. K. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. Infect Immun. 2002;70:1924–35.

Singh, D. V., Sanyal, S. C. Enterotoxicity of clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. Journal of Medical Microbiology, v.36, n. 4, p. 269-272, 1992.

Sinha, S., T. Shimada, T. Ramamurthy, S. K. Bhattacharya, S. Yamasaki, Y. Takeda, and G. B. Nair. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. Journal of Medical Microbiology, v. 53, p. 527–534, 2004.

Sohn, H. J.; Nam, D. H; Kim, Y. S; Paik, H J. Endogenous *Aeromonas hydrophila* endophthalmitis in an immunocompromised patient. Korean Journal of Ophthalmology, v. 21, p. 45-47, 2007.

Soler, L., Figueras, M. J., Chacón, M. R., Vila, J., Marco, F., Martínez-Murcia, A. J., Guarro, Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas*. Federation of European Microbiological Societies Immunology Medical Microbiology, v. 32, p.243-247, 2002.

Soler L, Marco F, Vila J, Chacon MR, Guarro J, Figueras MJ. Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp. Journal of Clinical Microbiology, v. 41, p. 5732–

5734, 2003.

Stainer, R. Y. A note on the taxonomy of *P. hydrophilus*. *Journal of Bacteriology*, v. 46, p. 213-214, 1943.

Standing Committee of Analysts - Environment Agency. *The Microbiology of Drinking Water*. "The isolation and enumeration of *Aeromonas* and *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration". Europa. Part 8. Setembro/2010.

Sugita, H., Tanaka, K., Yoshinami, M., Deguchi, Y. Distribution of *Aeromonas* species in the intestinal tracts of river fish. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n.11, p. 4128-4130, 1995.

Surek, M., Vizzotto, B. S., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., Dallagassa, C. B., Farah, S. M. S. S., Fadel-Picheth, C. M. T., Identification and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. Isolated from stool samples of Brazilian subjects with diarrhea and healthy controls. *Journal of Medical Microbiology*. v.59, p. 373-374, 2010.

Szczuka, E., Kaznowski, A. Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp. strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 220-228, 2004.

Tao, C., M. Kang, Z. Chen, Y. Xie, H. Fan, L. Qin, Y. Ma. Microbiologic study of the pathogens isolated from wound culture among Wenchuan earthquake survivors. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 63, p. 268–270, 2009.

Tena. D., Gonzalez-Praetorius, A., Gimeno, C., Perez-Pomata, M. T., Bisquert, J. Infección extraintestinal por *Aeromonas* spp.: revisión de 38 casos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 25, n.4, p. 235-241, 2007.

Thomsen, R. N.; Kristiansen, M. M. Three cases of bacteraemia caused by *Aeromonas veronii* biovar *sobria*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 33, n. 9, p. 718-719, 2001.

Tomás, J. M. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. *International Scholarly Research Network*, v. 2012, 2012.

Tsai, M. S., Kuo, C. Y., Wang, M. C., Wu, H. C., Chien, C. C., Liu, J. W. Clinical features and risk factors for mortality in *Aeromonas* bacteremic adults with hematologic malignancies. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 39, n. 2, p. 150-154, 2006.

Varnam, A. H.; Evans, M. G. *Aeromonas*. In: *Foodborne Pathogens: an Illustrated Text*. London: Manson Publishing, 1996. 557 p. cap. 9, p.185-199. ISBN 1-874545-41-3.

Vila, J., Ruiz, J., Gallardo, F., Vargas, M., Soler, L., Figueras, M. J., Gascon, J. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Disease*, v. 9, n. 5, p. 552-555, 2003.

VonGraevenitz, A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. *Infection*, v. 35, p. 59-64, 2007.

Wu, C. J., Wu, J. J., Yan, J. J., Lee, H. C., Lee, N. Y., Chang, C. M, Hsin-I Shih, Wu, H. M., Wang, L. R., Ko, W. C. Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan. *The Journal of Infection*, v. 54, n. 2, p. 151-158, 2007.

Xu, X. J., Ferguson, M. R., Popov, V. L., Houston, C. W., Peterson, J. W., Chopra, A. K. Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: development of transposon and isogenic mutants. *Infection and Immunity*, v. 66, p.3501–3509, 1998.

Ye, Y.; Xu, X. H.; Li, J. B. Emergence of CTX-M-3, TEM-1 and a new plasmid-mediated MOX-4 AmpC in a multiresistant *Aeromonas caviae* isolate from a patient with pneumonia. *Journal of Medical Microbiology*, v. 59, p. 843-847, 2010.

Yu, C. P., Farrell, S. K., Robinson, B., Chu, K. H. Development and application of real-time PCR assays for quantifying total and aerolysin genecontaining *Aeromonas* in source, intermediate, and finished drinking water. *Environmental Science and Technology*, v. 42, n. 4, p. 1191–1200, 2008.

Zanella, J. F. P.; Luz, R. B.; Dalcin, T.; Delamare, A. P. L.; Costa, S. O. P.; Echeverrigaray, S.; Wesphalen, F. Avaliação e isolamento de *Aeromonas*. Simpósio de Ciência e Tecnologia da Universidade de Caxias do Sul - RS, Caxias do Sul, maio 2004.

Zhiyong, Z., Xiaoju, L., Yanyu, G. *Aeromonas hydrophila* infection: clinical aspects and therapeutic options. *Reviews in Medical Microbiology*, v. 13, p. 151-162, 2002.