



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Manuela Bernardo de Souza

**Caracterização por métodos fenotípicos e moleculares dos mecanismos de
resistência aos antimicrobianos em cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de
origens diversas**

Rio de Janeiro

2016

Manuela Bernardo de Souza

Caracterização por métodos fenotípicos e moleculares dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de origens diversas

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadoras: Prof.^a Dra. Angela Corrêa de Freitas Almeida

Prof.^a Dra. Mara Lucia Penna Queiroz

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S729 Souza, Manuela Bernardo de.

Caracterização por métodos fenotípicos e moleculares dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de origens diversas / Manuela Bernardo de Souza – 2016.
106 f.

Orientadoras: Angela Corrêa de Freitas Almeida
Mara Lucia Penna Queiroz

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

1. *Aeromonas* - Teses. 2. Resistência em microorganismos – Teses. I. Almeida, Angela Corrêa de Freitas. II. Queiroz, Mara Lucia Penna. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 576.851.142

Bibliotecária: Sandra Regina Sahb Furtado CRB7/3918

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Manuela Bernardo de Souza

Caracterização por métodos fenotípicos e moleculares dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de origens diversas

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 27 de setembro de 2016.

Orientadoras: Prof.^a Dra. Angela Corrêa de Freitas Almeida
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ
Prof.^a Dra. Mara Lucia Penna Queiroz
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof. Dr. Robson de Souza Leão
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Rachel Leite Ribeiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, minha grande amiga e incentivadora de todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado saúde e força para superar todas as dificuldades surgidas ao longo desses dois anos. Por ter me dado coragem para sair da minha zona de conforto e ir em busca dos meus sonhos. Pelos obstáculos em meu caminho, eles impulsionaram meu amadurecimento pessoal e profissional. Por ter colocado tantas pessoas especiais em minha vida, sem elas a realização deste trabalho não seria possível.

À minha família que me apoiou durante esses anos, que compreendeu minha ausência mesmo nos momentos mais difíceis, que tentou me poupar de notícias ruins para não prejudicar o meu desenvolvimento, que sempre acreditou na minha capacidade de ir mais longe. Eu amo vocês!

Às minhas queridas orientadoras Angela Corrêa de Freitas Almeida e Mara Lucia Penna Queiroz, por compartilharem conhecimento, por corrigirem minhas falhas, pelo incentivo, pela disponibilidade, flexibilidade, paciência, humanidade e profissionalismo.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Microbiologia da UERJ pelos ensinamentos.

Aos professores Robson de Souza Leão, Ana Cláudia de Paula Rosa e Rachel Leite Ribeiro pela participação na banca examinadora e por contribuírem com o aperfeiçoamento deste estudo.

À professora Ana Cláudia de Paula Rosa pela revisão deste trabalho.

Às professoras Wania Ferraz Pereira Manfro e Selma Soares de Oliveira por aceitarem o convite para serem membros suplentes da banca examinadora.

À professora Vania Merquior por toda cordialidade e assistência prestada durante o processo seletivo e durante minha permanência na pós-graduação.

À Carla Freitas, secretária da pós-graduação, pela disponibilidade, profissionalismo e simpatia.

À Marcelly Jayme, Paula Favila e Jorge Matos pela amizade, disponibilidade, por me auxiliarem na realização dos experimentos e por compartilharem seus conhecimentos e experiências.

À minha querida turma de mestrado pelos bons momentos vividos e por serem tão prestativos.

Aos alunos de iniciação científica, Pedro Henrique Fontoura e Flávia Rodrigues, que me auxiliaram em etapas deste trabalho.

Aos técnicos do Departamento de Microbiologia e Imunologia da FCM , em especial à Emanoela, Márcia Jones, Denilson, Adriana e Lourdes pelo suporte técnico e pela disponibilidade.

A todos os alunos do laboratório 1 por proporcionarem um agradável ambiente de trabalho, em especial à Thays Araújo, Raquel Costa, Marcelly Jayme, Ricardo Braga, Ana Carolina e Maria por tornarem meus dias mais leves e alegres.

À Thatiane Santiago por ser minha procuradora no processo seletivo e por ser alguém com quem sempre posso contar, mesmo quando eu não mereço.

À Janaína de Freitas Nascimento pelo apoio e por me auxiliar na elaboração do abstract.

Às minhas *rommies* por amenizarem os momentos de saudade da família, pelo incentivo, pelos momentos de diversão que me permitiram manter o equilíbrio emocional.

À Bruno Machado e Sueli Maria por me ouvirem, suportaram meu estresse e por incentivarem.

À todos os amigos que compreenderam minha ausência durante a redação desta dissertação.

À FAPERJ e à UERJ/SR2, suporte financeiro.

RESUMO

SOUZA, Manuela Bernardo. *Caracterização por métodos fenotípicos e moleculares dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em cepas de Aeromonas spp. isoladas de origens diversas*. 2016. 106f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Aeromonas, micro-organismos amplamente distribuídos no ambiente, são responsáveis por diversas doenças infecciosas em animais e em humanos, imunocompetentes e imunocomprometidos. O gênero é considerado atualmente um patógeno emergente em infecções nosocomiais. Foram estudadas 46 amostras de *Aeromonas* spp., obtidas a partir de peixes, humanos, queijo, hortaliças e água. As cepas foram caracterizadas fenotipicamente como *A. caviae* (n=30), *A. hydrophila* (n=14) e *A. veronii* bv. *sobria* (n=2). A avaliação quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada pelo método de disco-difusão. Todas as cepas foram susceptíveis a ciprofloxacina, gentamicina, amicacina, cefepime e aztreonam. O maior percentual de resistência foi observado para a ampicilina/sulbactam (71,7%), seguido por ceftazidima (32,6%), amoxicilina/ácido clavulânico (30,4%), cefotaxima (21,7%), ceftazidima (19,6%) e tetraciclina (19,6%). As cepas que apresentaram os critérios de triagem determinados pelo CLSI (2015) para enterobactérias, foram submetidas ao teste de detecção fenotípica da produção de ESBLs e à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos ceftazidima e cefotaxima. A produção fenotípica de ESBL foi confirmada para uma cepa de *A. caviae* isolada de espécime clínico. Houve divergência entre alguns resultados do teste de disco-difusão e da concentração inibitória mínima em relação aos antimicrobianos testados. Através da técnica de reação em cadeia polimerase (PCR), foram pesquisados os genes de resistência *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1LIKE}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER} e *bla*_{GES}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *tetA*, *tetB*, *tetG*, *catA*, *cmlA*, *flo*, *sul1*, *sul2*, *intl1* e integron de classe 1. Os genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{GES}, *tetB*, *catA*, *sul1*, *intl1* e integron de classe 1 foram amplificados em *Aeromonas* spp. As cepas que apresentaram características genotípicas de resistência foram submetidas à tipagem baseada nos replicons dos principais grupos de incompatibilidade de plasmídeos em enterobactérias. A análise foi positiva para os grupos incFIA, incFIB e incB/O, que estiveram distribuídos entre duas cepas de *A. caviae* (*tetB* positivas) isoladas de espécimes clínicos.

Palavras chave: *Aeromonas*. Susceptibilidade aos antimicrobianos. Genes de resistência.

ABSTRACT

SOUZA, Manuela Bernardo. *Characterization by phenotypic and molecular methods of antimicrobial resistance mechanisms to antibiotics in Aeromonas spp strains. isolated from various sources* 2016.106f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Aeromonas, microorganisms widely distributed in the environment, are responsible for various infectious diseases in animals and both immunocompetent and immunocompromised individuals. This genus is currently considered an emerging pathogen in nosocomial infections. 46 samples of *Aeromonas* spp obtained from fish, human, cheese, vegetables and water were studied. Strains were phenotypically characterized as *A. caviae* (n = 30), *A. hydrophila* (n = 14) and *A. veronii* bv. *sobria* (n = 2). Assessment of susceptibility to antimicrobial agents was performed by disk diffusion test. The strains were fully susceptible to ciprofloxacin, gentamicin, amikacin, cefepime and aztreonam. The highest percentage of resistance was observed for ampicillin / sulbactam (71.7%), followed by ceftaxime (32.6%), amoxicillin / clavulanic acid (30.4%), cefotaxime (21.7%), ceftazidime (19.6%) and tetracycline (19.6%). The strains with the screening criteria determined by the CLSI (2015), were subjected to phenotypic testing for production of ESBLs and determining minimum inhibitory concentration (MIC) of ceftazidime and cefotaxime antimicrobials. Phenotypic ESBL production was confirmed for a strain of *A. caviae* isolated from clinical specimen. Some MIC results were discrepant relative to the disc-diffusion test. Resistance genes, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1LIKE}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER e} *bla*_{GES}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* *qepA*, *tetA*, *tetB*, *tetG*, *catA*, *cmlA*, *floR*, *sul1*, *sul2*, *intl1* and class 1 integron were searched by polymerase chain reaction (PCR). Genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{GES}, *tetB*, *catA*, *sul1*, *intl* and class 1 integron were amplified in *Aeromonas* spp. Samples that showed genotypic characteristics of resistance were subjected to typing based on replicons of the major plasmid incompatibility groups enterobacteria. Analysis was positive for incFIA, incFIB and IncB /O groups, which were distributed between two strains of *A. caviae* (positive *tetB*) isolated from clinical specimens.

Keywords: *Aeromonas*. Antimicrobial susceptibility. Resistance gene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1–	Características diferenciais de <i>Aeromonas</i> sp., <i>Vibrio</i> sp. e <i>P.shigelloides</i>	21
Quadro 2–	Distribuição de β -lactamases codificadas cromossomicamente e β -lactamases de amplo espectro (ESBLs) produzidas por diferentes espécies de <i>Aeromonas</i>	25
Quadro 3–	Classificação das principais β -lactamases.....	28
Quadro 4–	Origem das cepas de <i>Aeromonas</i> spp. utilizadas no estudo.....	41
Quadro 5–	Descrição dos iniciadores, sequências nucleotídicas, reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado nas diferentes PCR.....	54
Quadro 6–	Resultado dos testes de caracterização fisiológica das 46 cepas de <i>Aeromonas</i>	62
Gráfico 1–	Percentual de susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de <i>Aeromonas</i> spp. isoladas de diferentes origens.....	64
Gráfico 2–	Percentuais de não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de <i>Aeromonas caviae</i>	68
Gráfico 3–	Percentuais de não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de <i>Aeromonas hydrophila</i>	68
Gráfico 4–	Percentuais de não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de <i>Aeromonas veronii</i> bv <i>sobria</i>	69
Gráfico 5–	Percentuais de não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas clínicas.....	71
Gráfico 6–	Percentuais de não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas ambientais.....	71
Gráfico 7–	Percentuais de não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas isoladas de alimentos.....	72
Figura 1–	Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos da PCR para a pesquisa dos genes <i>bla</i> _{CTX-M2} e <i>bla</i> _{CTX-M9}	76
Figura 2–	Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos da PCR para a pesquisa do gene <i>bla</i> _{GES}	77
Figura 3–	Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos da PCR para a pesquisa do gene <i>sull</i>	78

Figura 4–	Eletroforese de DNA em gel agarose 2% (p/v) de produtos da PCR para a pesquisa do gene da integrase da classe 1.....	79
Figura 5–	Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos de PCR para a pesquisa de integron classe 1.....	80
Figura 6–	Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos da PCR para a pesquisa do gene <i>catA</i>	81
Figura 7–	Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos da PCR para os genes <i>tetA e tetB</i>	82
Figura 8–	Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos da PCR para a pesquisa dos replicons FIA, FIB e W.....	83
Figura 9–	Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos de PCR para a pesquisa do replicon B/0.....	84
Quadro 7-	Perfil de resistência aos antimicrobianos, genes de resistência, presença de integrons e grupos de incompatibilidade (Incs) de plasmídeos de enterobactérias em cepas de <i>Aeromonas</i> spp. isoladas de origens diversas.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Percentuais de susceptibilidade e não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de <i>Aeromonas</i> spp. de acordo com a espécie.....	67
Tabela 2–	Percentuais de susceptibilidade e não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de <i>Aeromonas</i> spp. de acordo com a origem de isolamento.....	70
Tabela 3–	Perfis de resistência aos antimicrobianos em cepas de <i>Aeromonas</i> spp. isoladas de diferentes origens.....	73
Tabela 4–	Determinação da CIM para cefotaxima em cepas de <i>Aeromonas</i> spp.....	74
Tabela 5–	Determinação da CIM para ceftazidima em cepas de <i>Aeromonas</i> spp.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>GyrB</i>	DNA girasse
AAA	Aminoglicosídeo acetiltransferases
AK	Amicacina
AMC	Amoxacilina/ Àcido Clâvulânico
AMES	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
AmpC	β -lactamases de classe C
ANT	Aminoglicosídeos nucleotidiltransferases
ANVISA	AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AZT	Aztreonam
BD	Becton Dickison
BOXPCR	<i>BOX-A1R-based repetitive extragenic palindromic</i>
C	Cloranfenicol
CAMHB	Cation-adjusted Meller-Hinton broth
CATs	Acetiltransferases
CAZ	Ceftazidima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
DDST	Teste de sinergismo de duplo disco
DHPS	Diidropteroato sintetase
DIMI	Disciplina de Microbiologia e Imunologia
DNA	Àcido desoxiribonucléico
DNASE	Desoxirribonuclease
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- polymerase chain</i>

ESBL	β -lactamases de amplo espectro
ETP	Ertapenem
EUA	Estados Unidos da América
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FEP	Cefepime
FOX	Cefoxitina
GN	Gentamicina
GSP	<i>Pseudomonas Aeromonas Selective</i>
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IMP	Imipemenase
INC	Grupo de incompatibilidade de plasmídeos
IPM	Imipenem
ISR	<i>Intergenic Spacer Region</i>
KPC	<i>Klebsiela pneumoniae</i> carbapenemase
KOH	Hidróxido de potássio
MBL	Metallo- β -lactamases
MDR	Multidrug resistance
MEM	Meropenem
MR-VP	<i>Metyl-red</i> — Voges Proskauer
NDM	Nova Deli Metallo- β -lactamases
NOR	Norfloxacina
OXA	β -lactamases de classe D
PABA	Ácido p-aminobenzóico
PBPS	Proteínas ligadoras de penicilinas
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>
PH	Potencial de hidrogênio
TZP	Piperaciclina/Tazobactam
PMQR	Plasmídeo mediador de resistência às quinolonas
PRBT	Tipagem de replicons de plasmídeos por reação em cadeia da polimerase

rDNA	Gene do RNA ribossômico
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico
<i>rpoD</i>	RNA polimerase
rRNA	RNA ribossômico
SAM	Ampicilina/ Sulbactam
SIM	Motilidade Indol Sulfeto
SR2	Sub-Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa
STX	Sulfametoxazol/ Trimetoprim
TBE	TRIS/BORATO/EDTA
tRNA	RNA transportador
TE	Tetraciclina
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	Piperaciclina/Tazobactam
TZP	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UERJ	Universidade Estadual do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VIM	Verona imipenemase

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celcius	U	Unidade
%	Porcentagem	=	Igual
&	E		
NaCl	Cloreto de Sódio		
β	Beta		
+	Presente		
-	Ausente		
V	Variável		
\pm	Mais ou menos		
Nº	número		
mL	mililitro		
HCl	hipoclorito		
H ₂ O ₂	molécula de água		
H ₂ S	Sulfeto de enxofre		
h	Horas		
μ g	Microgramas		
Mg ⁺⁺	Magnésio		
Ca ⁺⁺	Cálcio		
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio		
mM	Milimolar		
\leq	Menor que		
\times	Multiplicação		
mg	Miligrama		
μ L	Microlitro		
pb	Pares de bases		
'	Linha		
Min	Minutos		
s	Segundos		
μ M	Micromolar		

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	36
1.1	Geral	36
1.2	Específicos	36
2	MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1	Desenho do estudo	37
2.2	Amostras bacterianas	37
2.3	Conservação e condições de cultivo das cepas bacterianas	38
2.4	Caracterização fisiológica do gênero <i>Aeromonas</i>	38
2.4.1	<u>Plaqueamento seletivo</u>	38
2.4.2	<u>Teste de produção da enzima citocromo-oxidase</u>	39
2.4.3	<u>Teste de oxidação-fermentação da glicose</u>	39
2.4.4	<u>Teste de halotolerância</u>	43
2.4.5	<u>Fermentação do inositol</u>	43
2.4.6	<u>Teste de produção de Dnase</u>	43
2.4.7	<u>Teste da catalase</u>	44
2.5	Identificação fisiológica em nível de espécie	44
2.5.1	<u>Teste de descarboxilação e deidrolação de aminoácidos</u>	44
2.5.2	<u>Teste de produção de ácidos a partir da Arabinose</u>	45
2.5.3	<u>Teste de produção de acetoína</u>	45
2.5.4	<u>Teste de produção de gás a partir da glicose</u>	46
2.5.5	<u>Teste de hidrolise de esculina</u>	46
2.5.6	<u>Teste de utilização do citrato</u>	47
2.5.7	<u>Teste de produção de indol, motilidade e H₂S</u>	47
2.6	Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de <i>Aeromonas</i> spp. por teste de disco-difusão	47
2.6.1	<u>Preparo do inóculo</u>	47
2.6.2	<u>Teste de disco-difusão (TDD)</u>	48
2.6.3	<u>Antimicrobianos</u>	48
2.7	Detecção fenotípica de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBLs)	49

2.8	Determinação da concentração inibitória mínima.....	50
2.8.1	<u>Soluções estoque dos sais de antimicrobianos.....</u>	50
2.8.2	<u>Preparo da suspensão bacteriana.....</u>	50
2.8.3	<u>Diluição do antimicrobiano.....</u>	51
2.8.4	<u>Inoculação em placas para microdiluição.....</u>	51
2.9	Detecção de genes de resistência.....	51
2.9.1	<u>Extração do DNA por lise térmica.....</u>	52
2.9.2	<u>Reação em cadeia da polimerase (PCR).....</u>	52
2.9.3	<u>Eletroforese em gel de agarose 2%.....</u>	52
2.10	Tipagem baseada nos replicons dos principais grupos de incompatibilidade de plasmídeos em enterobactérias.....	53
3	RESULTADOS.....	61
3.1	Identificação.....	61
3.2	Teste de disco-difusão e detecção fenotípica de ESBLs.....	61
3.3	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	74
3.4	Detecção de genes de resistência.....	75
4	DISCUSSÃO.....	85
	CONCLUSÃO.....	93
	REFERÊNCIAS.....	95

INTRODUÇÃO

Características gerais do gênero *Aeromonas*

Aeromonas foi observada pela primeira vez em 1891 associada à bacteremia em animais pecilotérmicos (rãs). Alguns anos depois elas foram relatadas na literatura como *Bacillus hydrophilus fuscus* e descritas como um bacilo monotríqueo polar capaz de produzir gás a partir da glicose. A taxonomia do gênero, iniciada apenas em 1943, é complexa e tem mudado continuamente (SHOTTS, 1984; TOMÁS, 2012).

O gênero *Aeromonas* inicialmente foi incluído na família *Vibrionaceae*, juntamente com *Vibrio*, *Pleisiomonas* e *Photobacterium*. No entanto, estudos filogenéticos comprovaram que as *Aeromonas* apresentam características intermediárias entre as famílias *Vibrionaceae* e *Enterobacteriaceae*, mas possuem história evolutiva suficientemente diferente para pertencerem a uma família própria, justificando desse modo a criação da família *Aeromonadaceae* (COLWELL et al., 1986).

A família *Aeromonadaceae* é composta por bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, quimiotróficos, com crescimento ótimo em temperaturas de cerca de 22°C a 28°C. Geralmente são móveis, possuem flagelo polar, reduzem nitrato em nitrito e são capazes de fermentar a glicose e vários hidratos de carbono, produzindo ácidos e muitas vezes gases, são catalase e oxidase positivos, com exceção de *Tolumonas*. Nas primeiras edições do Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey esta família era formada apenas pelo gênero *Aeromonas* e foi dividida em dois principais subgrupos: espécie imóvel e psicrófilas (*A. salmonicida*) e as espécies móveis e mesófilas (*A. hydrophila*, *A. caviae*, e *A. sobria*). A edição atual inclui os seguintes gêneros: *Aeromonas*, *Oceanimonas*, *Oceanisphaera* e *Tolumonas* (MARTIN-CARNAHAN & JOSEPH, 2005; TOMÁS, 2012)

Além das diferenças bioquímicas entre as espécies, a classificação atual do gênero é baseada em análises filogenéticas utilizando os genes *gyrB* (DNA girase) e *rpoD* (RNA polimerase), do sequenciamento da subunidade 16S do RNA ribossomal (rRNA) e da hibridização DNA-DNA, além de testes bioquímicos extensos (JANDA & ABBOTT, 2010; KUPFER et al., 2006).

Entre os anos de 1943 e 2016 cerca de 35 espécies e 12 subespécies de *Aeromonas* já foram relatadas na literatura: *A. allosaccharophila*, *A. aquariorum*, *A. aquatica*, *A.*

australiensis, *A. bestiarum*, *A. bivalvium*, *A. caviae*, *A. culicicola*, *A. dhakensis*, *A. diversa*, *A. encheleia*, *A. enteropelogenes*, *A. eucrenophila*, *A. filandensis*, *A. fluvialis*, *A. hydrophila*, *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes*, *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. hydrophila* subsp. *proteolytica*, *A. hydrophila* subsp. *ranae*, *A. ichthiosmia*, *A. jandaei*, *A. lacus*, *A. media*, *A. molluscorum*, *A. piscicola*, *A. popoffii*, *A. puntactata*, *A. puntactata* subsp. *caviae*, *A. puntactata* subsp. *puntactata*, *A. rivuli*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *smithia*, *A. sanarellii*, *A. schubertii*, *A. sharmana*, *A. simiae*, *A. taiwanensis*, *A. tecta*, *A. trota* e *A. veronii* (bv. *sobria* e bv. *veronii*) (EUZÉBY, 2016).

Espécies de *Aeromonas* já foram isoladas do solo, peixes, alimentos, animais domésticos, animais invertebrados e pássaros. Embora este gênero bacteriano seja comumente encontrado em diversos ambientes, eles habitam principalmente os ambientes aquáticos, como rios, lagos, lagoas, estuários de águas marinhas, água potável e de águas residuais em vários estágios de tratamento (PIOTROWSKA & POPOWSKA, 2015).

Inicialmente, *Aeromonas* eram reconhecidas apenas como causa de doenças sistêmicas em animais pecilotérmicos. Hoje o gênero é considerado também o agente etiológico responsável por uma variedade de complicações infecciosas em humanos, imunocompetentes e imunocomprometidos, além de terem sido relatadas como patógeno emergente em infecções nosocomiais (JANDA & ABBOTT, 2010; PARKER & SHAW, 2011).

A gastroenterite é a doença mais comumente associada ao gênero e pode evoluir para peritonite, colite ou colangite. *Aeromonas* podem estar relacionadas aos casos de diarreia dos viajantes, principal doença infecciosa relatada entre os viajantes internacionais. Estudos demonstraram uma prevalência de 2% de *Aeromonas* spp. entre esses casos. As espécies isoladas com maior frequência foram *A. veronii* bv. *sobria* e *A. caviae* (VILA et al., 2003; PARKER & SHAW, 2011).

As infecções extraintestinais incluem septicemia, infecções em feridas, majoritariamente infecções superficiais, mas também acometem tendões, músculos e ossos, infecções do trato respiratório, infecções oculares e síndrome hemolítico-urêmica (TOMÁS, 2012).

As infecções causadas por esse patógeno são facilmente prevenidas pela manutenção de condições sanitárias adequadas, tais como a higiene das mãos, tratamento de esgoto e higiene na preparação de alimentos, o cozimento adequado do produto alimentar também

minimiza a transmissão. A monitorização contínua da qualidade da água é essencial para minimizar o risco para a saúde devido às *Aeromonas* (JANDA & ABBOTT, 2010; IGBINOSA et al., 2012); .

Aeromonas spp. possuem a maioria dos fatores de virulência que permitem o estabelecimento de uma infecção. A presença de fímbrias, flagelos e cápsula auxiliam a ligação da bactéria à superfície do hospedeiro. A permanência no hospedeiro é acompanhada pela produção de exotoxinas, proteases, elastases, lipases e hemolisinas que causam destruição do tecido. Os sistemas de cápsula, camada S, lipopolissacarídeos, e porinas também reforçam os mecanismos de patogenicidade por comprometer a defesa do hospedeiro e os sistemas de secreção do tipo II e III permitem a evasão da bactéria da resposta imune (BATRA; MATHUR; MISRA, 2016).

Em *Aeromonas*, assim como em outros micro-organismos, os mecanismos de virulência e de resistência aos antimicrobianos podem ser regulados por um sistema de *Quorum Sensing*, um sistema de comunicação intercelular bacteriana pelo qual os micro-organismos são capazes de monitorar a densidade populacional através da produção e detecção de moléculas sinalizadoras (CHU & MCLEAN, 2016).

As infecções causadas por esse patógeno são facilmente prevenidas pela manutenção de condições sanitárias adequadas, tais como a higiene das mãos, tratamento de esgoto e higiene na preparação de alimentos, o cozimento adequado do produto alimentar também minimiza a transmissão. A monitorização contínua da qualidade da água é essencial para minimizar o risco para a saúde devido às *Aeromonas* (JANDA & ABBOTT, 2010; IGBINOSA et al., 2012) .

Aeromonas spp. possuem a maioria dos fatores de virulência que permitem o estabelecimento de uma infecção. A presença de fímbrias, flagelos e cápsula auxiliam a ligação da bactéria à superfície do hospedeiro. A permanência no hospedeiro é acompanhada pela produção de exotoxinas, proteases, elastases, lipases e hemolisinas que causam destruição do tecido. Os sistemas de cápsula, camada S, lipopolissacarídeos, e porinas também reforçam os mecanismos de patogenicidade por comprometer a defesa do hospedeiro e os sistemas de secreção do tipo II e III permitem a evasão da bactéria da resposta imune (BATRA; MATHUR; MISRA, 2016).

Identificação

Como citado anteriormente, o gênero é composto por bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose e crescem bem em meios de cultura comuns. Em meio ágar sangue, mais de 90% das cepas entre as espécies isoladas de humanos produzem β -hemólise, com exceção de *A. popoffi* e *A. trota* (0% e 50%, respectivamente) (JANDA & ABBOTT, 2010).

Algumas cepas de *Aeromonas*, principalmente *A. caviae*, quando cultivadas em meios contendo glicose apresentam o “efeito suicida”, caracterizado por uma alta mortalidade do micro-organismo após 12 horas de incubação. As estirpes metabolizam a glicose e como produto final produzem grande quantidade de ácidos, baixando excessivamente o pH do meio, causando mortalidade celular. O fenômeno foi descrito por NAMDARI & CABELLI (1989).

O ágar GSP (*Pseudomonas Aeromonas Selective Agar Base*) proposto por KIELWEIN (1969, 1971) é amplamente utilizado para o isolamento de *Aeromonas*. Este meio contém o indicador de pH vermelho de fenol e seus únicos nutrientes são o glutamato e o amido. A maioria dos micro-organismos não podem metabolizar estes compostos. A degradação do amido por *Aeromonas* spp. produz ácidos e torna o meio amarelo. *Aeromonas* são consideradas universalmente resistentes às penicilinas (penicilina, ampicilina, carbenicilina e ticarcilina). Por este motivo, a ampicilina pode ser incluída como suplemento seletivo e proporciona o isolamento de *Aeromonas* a partir de amostras contaminadas. (STRATEV; DASKALOV; VASHIN, 2015).

As bactérias deste gênero crescem em uma ampla faixa de condições ambientais, em temperaturas entre 4°C a 42°C (GALINDO & CHOPRA, 2007). Algumas espécies, como a *A. salmonicida* crescem entre 22°C e 28°C. Todas as espécies de *Aeromonas* resistem a uma faixa de pH entre 4,5 a 9, mas o pH ótimo é de 5,5 a 9 e o melhor intervalo de concentração de cloreto de sódio é de 0 a 4% (IGBINOSA et al., 2012).

Aeromonas e enterobactérias compartilham muitas características bioquímicas, mas são facilmente diferenciadas pela prova da oxidase, para a qual as *Aeromonas* são positivas (IGBINOSA et al., 2012). A ausência de crescimento em caldo nutriente a partir da concentração de 6% de NaCl, a hidrólise da gelatina e a resistência ao agente vibriostático O/129 são características apresentadas pelas *Aeromonas* que auxiliam na diferenciação entre algumas espécies de *Vibrio* (BATRA; MATHUR; MISRA, 2016). *Pleisiomonas* se diferenciam das *Aeromonas* pela capacidade de fermentar o inositol e por não apresentarem a

enzima Dnase (desoxiribonuclease) (**Quadro 1**) (ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2013).

A técnica molecular comumente recomendada aos laboratórios para a identificação de espécies e gêneros bacterianos é o sequenciamento do gene 16S do rRNA através de Polimorfismos de Tamanhos de Fragmentos de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) mostrando resultados satisfatórios, inclusive na identificação de novas espécies (TACÃO et al., 2005a). Outras técnicas moleculares utilizadas na identificação de *Aeromonas* incluem ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- polymerase chain reaction*) e BOXPCR (*BOX-A1R-based repetitive extragenic palindromic*) (DAVIN-REGLI et al., 1998; TACÃO et al., 2005b). KONG et al., (1999) sequenciaram a região espaçadora intergênica (*Intergenic Spacer Region* – ISR) 16S-23S do rDNA de algumas espécies de *Aeromonas* e, apesar da heterogeneidade encontrada, conseguiram desenhar iniciadores específicos para cada espécie, entretanto, sem fins diagnósticos ainda.

Quadro 1 — Características diferenciais de *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp. e *P. shigelloides*

Teste	<i>Aeromonas</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Pleisiomonas shigelloides</i>
Oxidase	+	+	+
Crescimento em caldo nutriente			
Sem NaCl	+	-	+
1% de NaCl	+	+	+
6% de NaCl	-	+	-
Hidrólise de gelatina	+	V	-
Dnase	+	+	-
Produção de ácidos a partir do inositol	-	V	+

Legenda: v= resultado variável; + = resultado positivo; - = resultado negativo.

Fonte: Adaptado de GHENGESH et al. (2008); ANVISA (2013).

Resistência aos antimicrobianos

Ao longo de toda história há uma batalha contínua entre a humanidade e micro-organismos causadores de doenças. Em meados do século 20, avanços no desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos trouxeram uma nova perspectiva para o tratamento de infecções, porém as bactérias desenvolveram rapidamente mecanismos de resistência contra estes agentes (TENOVER, 2006).

A resistência aos antimicrobianos pode ser definida como a capacidade dos micro-organismos resistirem aos efeitos de um ou mais agentes antimicrobianos. De acordo com a forma como o micro-organismo desenvolveu resistência, podemos classificá-la em dois grandes grupos: resistência intrínseca, ou natural, e resistência adquirida (ZHOU et al., 2015).

A resistência intrínseca ocorre quando a bactéria é naturalmente resistente ao antimicrobiano, ou seja, a resistência não está relacionada ao contato com o antibiótico (SAMARANAYAKE, 2012). É uma característica natural, herdada de forma invariável, que se associa com a grande maioria das cepas de uma mesma espécie (FORBES, 2009).

A resistência adquirida resulta da mutação ou desrepressão de genes cromossomais e plasmidiais ou da aquisição de novo material genético pela bactéria, principalmente por mecanismos de conjugação ou transformação (BARROS; MACHADO; SPRINZ, 2013).

Muitos genes de resistência a antimicrobianos estão localizados em plasmídeos e transposons, permitindo a sua transferência entre uma variedade de espécies bacterianas (ADESOJI; OGUNJOBI; OLATOYE, 2016).

Os mecanismos moleculares pelos quais as bactérias adquirem resistência aos antibióticos podem ser classificados nas seguintes categorias: concentração celular diminuída do antimicrobiano (por diminuição do influxo ou pelo aumento do efluxo), inativação enzimática da droga, alteração do sítio alvo e desenvolvimento de uma via bioquímica resistente (MADIGAN et al., 2016).

A vasta utilização de antimicrobianos em humanos, na medicina veterinária, e na agricultura contribuíram para a seleção e disseminação dos genes de resistência (ADESOJI; OGUNJOBI; OLATOYE, 2016). A contaminação da água, de alimentos e do ambiente com MDRs, ou seja, micro-organismos resistentes a pelo menos três classes de antimicrobianos, é uma rota importante para a propagação da resistência antimicrobiana e é, portanto, uma área crucial para controle. Além disso, a persistência de antimicrobianos no ambiente tem

recebido pouca atenção. Muitos não são biodegradáveis e podem persistir no ambiente por longos períodos de tempo (WELLINGTON et al., 2013).

A velocidade com que novos fenótipos de resistência surgiram e a escassez de novos agentes em processo de desenvolvimento de drogas elevou a importância para a saúde pública desta questão. Consequentemente, estamos atualmente enfrentando uma era pós-antibiótico. Nos últimos anos, organizações, governos, indústrias e setores acadêmicos em todo o mundo têm estudado estratégias, para resolver este problema (LEESON & HSUEH, 2015).

A determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos em *Aeromonas*, pode ser realizada pelo método de disco-difusão utilizando ágar Müller-Hinton e pela técnica de microdiluição em caldo Müller-Hinton cátion-ajustado. Os dados do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) são baseados em três espécies: *A. caviae*, *A. veronii* bv. *sobria* e *A. hydrophila* (CLSI, 2010).

Geralmente, *Aeromonas* são susceptíveis a piperacilina, azlocilina (penicilina semissintética não comercializada no Brasil), cefalosporinas de segunda e terceira geração, carbapenênicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprim, quinolonas e monobactâmicos (BATRA; MATHUR; MISRA, 2016).

Resistência aos β -lactâmicos

O aumento da resistência aos antimicrobianos, especialmente aos β -lactâmicos é uma característica de *Aeromonas* e vem sendo relatado não somente em amostras clínicas, como também em cepas de origem ambiental (MARAVIĆ et al., 2013). Antibióticos β -lactâmicos representam a classe de antimicrobianos mais comumente usada na prática clínica. São agentes bactericidas e seu mecanismo de ação é por inativação das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), enzimas com papel essencial na síntese da parede celular bacteriana (BROLUND & SANDEGREN, 2016).

Os β -lactâmicos estão distribuídos em vários grupos que apresentam em comum a presença do anel β -lactâmico: penicilinas naturais e semissintéticas, cefalosporinas de 1^a (Ex: cefalotina, cefazilina), 2^a (Ex: cefoxitina - cefamicinas), 3^a (Ex: cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona) e 4^a gerações (Ex: cefepima), oxicefamidas (Ex: moxolactam, não comercializado no Brasil), carbapenênicos (Ex: meropenem, ertapenem, doripenem e

imipenem) e monobactâmicos (aztreonam) (AUTO; CONSTANT; CONSTANT, 2008; BROOKS et al., 2014).

Os diversos tipos de β -lactâmicos se diferenciam por modificações estruturais, restritas às cadeias laterais, que podem modular: a estabilidade em meio ácido, fundamental para a atividade por via oral destes fármacos; a estabilidade frente às β -lactamases, enzimas bacterianas relacionadas à resistência, que hidrolisam o grupo farmacofórico (grupo estrutural do fármaco, responsável pela ação) destes antimicrobianos e o espectro de ação frente a bactérias Gram-negativas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

O mais importante mecanismo de resistência aos β -lactâmicos é a sua inativação por β -lactamases, enzimas que inativam o anel β -lactâmico. (ANTUNES & FISHER, 2014).

A primeira β -lactamase foi identificada em uma cepa de *Escherichia coli* em 1940, antes mesmo da penicilina ser usada na prática clínica (ABRAHAM & CHAIN, 1988). Muitos gêneros de bactérias Gram-negativas apresentam uma ocorrência natural, ou seja, β -lactamases mediadas cromossomicamente. Acredita-se que essas enzimas evoluíram a partir de PBPs, com as quais mostram alguma homologia de seqüência (DRAWZ & BONOMO, 2010).

Micro-organismos do gênero *Aeromonas* podem produzir vários tipos de β -lactamases. Três das maiores classes de β -lactamases mediadas cromossomicamente são encontradas em *Aeromonas*: β -lactamases classes B (metalo- β -lactamases), C (AmpC) e D (penicilinases). Outra importante classe de β -lactamases, as β -lactamases de classe A ou de espectro estendido (ES β Ls), têm sido cada vez mais relatadas no gênero (CHEN; KO; WU, 2012) (**Quadro2**). Embora a resistência aos antimicrobianos nestes micro-organismos sejam geralmente mediadas por cromossomo, as β -lactamases produzidas por *Aeromonas* também podem ser codificadas por plasmídeos e integrons. (ARAVENA-ROMÁN et al., 2012).

Quadro 2 — Distribuição de β -lactamases codificadas cromossomicamente e β -lactamases de amplo espectro (ESBLs) produzidas por diferentes espécies de *Aeromonas*

Espécies	β -lactamases mediadas cromossomicamente			β -lactamases Adquiridas
	Classe B MBL	Classe C AmpC	Classe D Penicilinase	Classe A ESBL
<i>A. hydrophila</i>	+	+	+	Relatada
<i>A. caviae</i>	-	+	+	Relatada
<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	+	+/-	+	Relatada
<i>A. enteropelogene</i>	-	+	-	Não relatada

Legenda: + = presente; - = ausente; +/- = isolados com ou sem produção de β -lactamases foram relatadas.

Fonte: Adaptado de CHEN; KO; WU, 2012.

Existem dois esquemas para a classificação de β -lactamases. O esquema proposto por BUSH; JACOBY; MEDEIROS (1995) é baseado na preferência de substrato da enzima e da inativação diante de inibidores específicos. AMBLER (1980) considerou a similaridade entre as cadeias de aminoácidos dessas enzimas. O **Quadro 3** relaciona e exemplifica os dois esquemas de classificação.

As classes A, B e C, de Ambler têm sido relatadas como sendo codificadas cromossomicamente ou mediadas por plasmídeos, já as enzimas de classe D, originalmente só foram identificadas como β -lactamases mediadas por plasmídeos, mais tarde foi descoberto que algumas espécies de *Acinetobacter* apresentam enzimas OXA intrinsecamente. (EVANS & AMYES, 2014).

As β -lactamases de classe B (MBLs) são caracterizadas pela capacidade de hidrolisar todos os β -lactâmicos (incluindo carbapenem, a classe mais potente de β -lactâmicos) e por conferir resistência a inibidores de β -lactamases (sulbactam, ácido clavulânico e tazobactam). As MBLs não são capazes de hidrolisar o aztreonam e são inibidas por agentes quelantes de íons metálicos como ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

Dentre as carbapemenases mais importantes estão a IMP (imipenemase), de *Pseudomonas aeruginosa*, a KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), de *Klebsiella pneumoniae*, a NDM (Nova Deli Metalo- β -lactamases), de enterobactérias e as enzimas OXAs (Classe D), de *Acinetobacter baumannii*. (KARAIKOS & GIAMARELLOU, 2014; JEAN et al., 2015;). Os genes *bla_{VIM}* e *bla_{IPM}* já foram detectados em algumas espécies de

Aeromonas, mas existem poucos relatos na literatura. (NEUWIRTH et al., 2007; ADLER et al., 2014; ANTONELLI et al., 2016).

Geralmente, a capacidade de *Aeromonas* hidrolisar os carbapenêmicos é devido à metalo- β -lactamase CphA. A enzima está associada às espécies *A. hydrophila*, *A. veronii* bv. *sobria*, *A. veronii* bv. *veronii*, *A. jandaei* e *A. salmonicida*, mas não é relatada em *A. caviae*. Em estudo recente, o gene que codifica essa carbapenemase foi detectado em 77 de 100 isolados de *Aeromonas*, incluindo *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. dhakensis*, *A. jandaei* e *A. bestiarum*. Nenhuma das 14 cepas de *A. caviae* apresentou o gene (SINCLAIR et al., 2016). O gene para CphA apresenta localização cromossômica (JANDA & ABBOTT, 2010).

Em *Aeromonas*, as MBLs podem ser fenotipicamente detectadas utilizando um método de duplo disco, empregando ceftazidima ou imipenem, com um segundo disco contendo EDTA 500 mM sozinho ou em combinação com mercaptoetanol. (NEUWIRTH et al., 2007; LIBISCH et al., 2008).

Os micro-organismos que expressam AmpC betalactamases, são tipicamente resistentes às penicilinas, cefalosporinas, incluindo cefoxitina, cefotetam, ceftriaxona e cefotaxima. Os inibidores de enzimas da classe A, tais como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam tem menor efeito sobre AmpC β -lactamases, embora alguns tipos sejam inibidas por tazobactam ou sulbactam, essas enzimas são inibidas por cloxacilina, oxacilina e aztreonam. São β -lactamases geralmente codificadas por genes *bla* localizados cromossomicamente, mas as AmpCs transferidas por plasmídeos estão se tornando cada vez mais prevalentes. (JACOBY, 2009; DRAWZ & BONOMO, 2010). Já foram encontradas mais de vinte tipos de AmpC β -lactamases expressas em plasmídeos (XIA; GAO; TANG, 2016).

Assim como outras bactérias portadoras de genes AmpC, *Aeromonas* nem sempre expressam AmpC β -lactamases e podem ser susceptíveis a cefotaxima. Os mecanismos envolvidos na expressão dessas β -lactamases incluem a produção induzível de AmpC- β -lactamases na presença de determinados indutores como a cefoxitina e o imipenem ou ainda mutações que levam a produção de altos níveis de β -lactamases. O tratamento de infecções causadas por *Aeromonas* com cefalosporinas deve ser feito com precaução (CHEN; KO; WU, 2012).

As β -lactamases de amplo espectro (ES β LS) merecem destaque entre as β -lactamases. Os plasmídeos carreadores de genes que codificam ESBL frequentemente são conjugativos e também alojam determinantes de resistência a antimicrobianos não β -lactâmicos tais como tetraciclina, quinolonas ou aminoglicosídeos. Nesse caso, as estirpes ES β LS-positivas são

frequentemente multirresistentes. As opções terapêuticas para infecções bacterianas causadas por estas cepas são claramente limitadas (TACÃO et al., 2014).

A produção de ESBLs não é uma característica das *Aeromonas*. É geralmente associada à família Enterobacteriaceae. A maioria das ESBLs são β -lactamases de classe A, de acordo com a classificação de Ambler, e podem conferir resistência a todas as penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. A presença de ESBLs em *Aeromonas* spp. é relativamente rara em comparação com a família Enterobacteriaceae (MARAVIĆ et al., 2013).

Ainda não existe uma metodologia padrão para a detecção de ESBLs em *Aeromonas*. A maioria dos estudos utiliza testes de sinergia que tem como base o clavulanato. Entretanto, esse tipo de teste pode sofrer interferência na presença AmpC β -lactamases. Como algumas espécies de *Aeromonas* são produtoras de AmpCs, estudos compararam testes sinérgicos que utilizam o clavulanato a testes que utilizam cefepima, droga não hidrolisada por β -lactamases do tipo AmpC, e os testes se mostraram concordantes na detecção de ESBLs (WU et al., 2011).

Resistência aos Inibidores da via do folato

As sulfonamidas merecem atenção especial por causa de seu amplo uso, alta taxa de excreção, alta solubilidade e persistência no ambiente. Mesmo sem pressão seletiva, bactérias resistentes às sulfonamidas podem permanecer estáveis no ambiente aquoso durante 5 a 10 anos. As bactérias resistentes a este antimicrobiano podem ser mais persistentes do que o próprio antibiótico (GAO et al., 2012)

As sulfonamidas são antimicrobianos que atuam inibindo a biossíntese de folato por competir com o substrato natural ácido p-aminobenzóico (PABA) para a ligação de diidropteroato sintase (DHPS), uma enzima que participa da síntese de ácido fólico. A resistência bacteriana a sulfonamidas, no entanto, pode ocorrer por meio de mutações no gene cromossômico DHPS (folP) ou através da aquisição de um gene DHPS alternativo cujo produto tem uma baixa afinidade para sulfonamidas. Dentre os mecanismos citados, os genes *sul* representam a mais prevalente forma de resistência às sulfonamidas (ADESOJI; OGUNJOBI; OLATOYE, 2016).

Quadro 3 — Classificação das principais *B*-lactamases (continua)

Grupo funcional ¹	Classe Molecular ²	Substrato	Características	Inibição por AC ou TZB	Inibição por EDTA	Enzimas
1	C	Cefalosporinas	Maior hidrólise de cefalosporinas do que benzilpenicilinas, hidrólise de cefaminicinas.	Não	Não	<i>E.coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefalosporinas	Aumento da hidrólise de ceftazidima e muitas vezes outros oximino- β -lactâmicos	Não	Não	GC1, CMY-37
2 ^a	A	Penicilinas	Maior hidrólise benzilpenicilinas do que cefalosporinas	Sim	Não	PC1
2b	A	Penicilinas e Cefalosporinas de primeira geração	Hidrólise similar para cefalosporinas e benzilpenicilinas	Sim	Não	TEM-1, TEM-2, SHV-1, PER-1, VEB-1.
2be	A	Cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos	Hidrólise aumentada de oximino- β -lactâmicos (Cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, aztreonam).	Sim	Não	TEM-3, SHV2, CTX-M-15
2br	A	Penicilinas	Resistência ao ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam.	Não	Não	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos	Maior hidrólise para oximino- β -lactâmicos e resistência aos inibidores de <i>B</i> -lactamases	Não	Não	TEM-50
2c	A	Carbenicilina	Aumento da hidrólise de da carbenicilina	Sim	Não	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilina, cefepime e cefipiroma.	Aumento da hidrólise de da carbenicilina, cefepime e carbapenens.	Sim	Não	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Aumento da hidrólise de cloxacilina ou oxacilina	Variável	Não	OXA-1, OXA-10

Quadro 3 — Classificação das principais β -lactamases (conclusão)

Grupo funcional ¹	Classe Molecular ²	Substrato	Características	Inibição por AC ou TZB	Inibição por EDTA	Enzimas
2dc	D	Cefalosporinas de amplo espectro	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e de oximino- β -lactâmicos	Variável	Não	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenêmicos	Maior hidrólise de carbapenêmicos, oximino- β -lactâmicos e cefamicinas.	Variável	Não	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de amplo espectro	Hidrólise de cefalosporinas. Inibidas por ácido clavulânico, mas não por aztreonam.	Sim	Não	CepA
2f	A	Carbapenêmicos	Maior hidrólise de carbapenêmicos, oximino- β -lactâmicos e cefamicinas.	Variável	Não	KPC-2, IMI-1, SME-1, GES.
3 ^a	B(B1)	Carbapenêmicos	Hidrólise de amplo espectro, incluindo carbapenens, mas os não monobactâmicos.	Não	Sim	IMP-1 VIM-1, CcrA, IND-1.
	B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1.
3b	B(B2)	Carbapenêmicos	Hidrólise preferencial de carbapenêmicos	Não	Sim	CphA, Sfh-1
4	-		Miscelânea de enzimas não seqüenciadas e que não estão inclusas em outros grupos.			

Legenda: 1- Segundo BUSH, JABOB, MEDEIROS (1995); 2- Segundo AMBLER (1980); TZB=Tazobactam; AC=Ácido clavulânico; EDTA= Ácido etilenodiaminotetracético. Fonte: Adaptado de BUSH; JACOBY, 2010 .

A trimetoprima também inibe a produção de ácido tetra-hidrofólico, mas por mecanismo diferente das sulfonamidas, isto é, inibe a enzima di-hidrofolato redutase. Sua especificidade em relação às bactérias baseia-se em sua maior afinidade pela redutase bacteriana do que pela enzima humana (LEVINSON, 2016).

O sulfametoxazol, um dos principais antimicrobianos da classe das sulfonamidas, e o trimetoprim foram sintetizados em épocas distintas, 1936 e em 1962, respectivamente. Usados isoladamente são drogas bacteriostáticas, mas estudos demonstraram que associadas, por agirem sobre o mesmo mecanismo e de maneira sequencial, potencializam seus efeitos antimicrobianos, ao ponto de se tornarem uma nova droga com efeito bactericida (AUTO; CONSTANT; CONSTANT, 2008).

A resistência à sulfonamida em bacilos Gram-negativos geralmente surge da aquisição de qualquer um dos dois genes *sul1* e *sul2* que codificam formas de di-hidropteroato sintetase que não são inibidos pela droga. O gene *sul1* é normalmente encontrado ligado a outros genes de resistência nos integrons de classe 1, enquanto *sul2* é geralmente localizado em pequenos plasmídeos não conjugativos ou grandes plasmídeos de multirresistência transmissível. O gene de resistência *sul3*, mais raro, também pode ser transmitido por plasmídeos (ANTUNES et al., 2005).

Resistência à tetraciclina

A tetraciclina inibe o crescimento bacteriano através da inibição da síntese protéica. O antimicrobiano se liga a subunidade ribossomal 30S impedindo que o amioacil-tRNA se ligue a unidade. A resistência à tetraciclina é geralmente conferida pela aquisição de genes de resistência associados a elementos móveis, como plasmídeos, transposons e bacteriófagos (PALÚ et al., 2006; ADESOJI et al., 2015). Cerca de três mecanismos de resistência à tetraciclina são conhecidos: Efluxo, proteção ribossomal e inativação química da droga (NELSON; LEVY, 2011). Os genes de resistência associados ao mecanismos de efluxo são: *tet* (A), (B), (C), (D), (E), (G), (I), (M) e (K). Os genes *tet* (K), (L), (M), (O), (S), (P), (Q), (B), (D), (H) e (C) estão relacionados com os mecanismos de efluxo e/ou proteção ribossomal e o gene *tet* (X) à inativação da tetraciclina (NG et al., 2001).

Um estudo realizado por BALASSIANO et al. (2007) demonstrou a presença de genes *tetA* e *tetE* em cepas clínicas de *Aeromonas* spp. e de alimentos isoladas no Brasil. Os genes de resistência apresentaram localização cromossômica e plasmidial.

Resistência aos Aminoglicosídeos

Os aminoglicósídeos (estreptomicina, canamicina, amicacina, gentamicina e tobramicina) são antimicrobianos de atividade de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Inicialmente, os aminoglicosídeos são internalizados por um sistema de transporte associado à membrana e depois se ligam a um sítio do RNA 16S que conduz à interrupção da síntese de proteínas e eventual morte celular (UDUMULA et al., 2013; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015).

Apesar da atividade de amplo espectro e sucesso clínico dos aminoglicosídeos, a utilidade no controle de infecções bacterianas tem sido ofuscada pelo surgimento de mecanismos de resistência (COX et al., 2015). A resistência aos aminoglicosídeos pode ocorrer por redução da permeabilidade da membrana celular bacteriana por bombas de efluxo e por alteração do alvo por mutações no RNA 16S e em proteínas ribossomais ou metilação por proteínas específicas (POULIKAKOS & FALAGAS, 2013).

As enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) são o fator de resistência mais importante e estes incluem aminoglicosídeo acetiltransferases [AAC (6')], aminoglicosídeos nucleotidiltransferases [ANT (4')] e aminoglicosídeos fosfotransferases [APH (3')]. Aproximadamente 100 dessas enzimas são conhecidas e a distribuição molecular e os tipos de enzimas difere pela região (XIAO & HU, 2012). Os genes que codificam as AMEs são frequentemente localizados em plasmídeos, transposons e integrons, que resultam na difusão rápida de resistência ao antimicrobiano, a nível molecular (SHAKIL et al., 2007).

Resistência às quinolonas e fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina) são um grande grupo de compostos sintéticos que foram originalmente desenvolvidos como agentes antimicrobianos para infecções das vias urinárias e respiratórias, mas também são eficazes para muitas outras doenças (PARSHIKOV & SUTHERLAND, 2012; BROOKS et al., 2014). A maioria das espécies bacterianas codifica dois tipos distintos, porém homólogos de topoisomerase tipo II, a girase e a topoisomerase IV. Estas enzimas desempenham papel essencial nos processos relacionados aos ácidos nucleicos (THONG et al., 2016).

As quinolonas têm sido amplamente utilizadas e este fato conduziu a um aumento da resistência bacteriana a esta classe de antimicrobianos. A resistência às quinolonas é principalmente devido a mecanismos mediados cromossomicamente, incluindo mutações em alvos da droga (DNA-girase e topoisomerase), diminuição da acumulação de quinolonas (bomba de efluxo e diminuição da expressão de porinas) (ZHANG et al., 2012).

O plasmídeo mediador de resistência às quinolonas (PMQR) foi relatado em 1998, 31 anos depois após o ácido nalidíxico começar a ser usado clinicamente. O primeiro mecanismo de resistência descoberto relacionado a estes plasmídeos foi associado ao gene *qnr*. Assim que esse gene foi clonado e sequenciado, a identificação por PCR se tornou mais fácil e logo esses plasmídeos foram encontrados, em baixa frequência, em bactérias isoladas de diversos locais do mundo (HOOPER & JACOBY, 2016). Os genes *qnr* codificam pentapeptídeos repetidos que se ligam e protegem a DNA topoisomerase tipo II da inibição por quinolonas. Múltiplos genes *qnr* já foram caracterizados: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* e *qnrD* (SILVA-SÁINCHÉZ et al., 2013).

Atualmente, outros dois mecanismos de resistência são relacionados ao PMQRs. O gene *aac* (6') IB-Cr que codifica uma nova variante de acetil transferase aminoglicosídeo (AAC) capaz de reduzir a atividade antimicrobiana de algumas fluoroquinolonas, incluindo norfloxacina e ciprofloxacina, através da N-acetilação do anel piperazil destes compostos e o gene *qepA* que codifica uma bomba de efluxo (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ; GARZA-MAYÉN; VÁZQUEZ-LÓPEZ, 2015).

Diferentes estudos relataram a presença de plasmídeo mediador de resistência às quinolonas em *Aeromonas* com o potencial de se disseminar por transferência horizontal de genes (VARELA; NUNES; MANAIA, 2016).

Resistência ao Cloranfenicol

O cloranfenicol age inibindo a síntese proteica através da afinidade pela peptidiltransferase da subunidade ribossomal 50S. O espectro de ação dos cloranfenicóis inclui bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias (VAN HOEK et al., 2011).

A inativação enzimática do cloranfenicol por diferentes tipos de acetiltransferases (CATs) foi o primeiro mecanismo de resistência descoberto para esses antimicrobianos e também é o mais frequente (SCHWARZ et al., 2004). Outros mecanismos são conhecidos: efluxo de cloranfenicol mediado pelos genes *cmlA*, *floR*, *fexA*, *pexA* e *fexB* e a presença de uma rRNA metilase mediada pelo gene *cfr* que confere simultaneamente resistência ao cloranfenicol, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas, e estreptograminas (LI et al., 2013).

Integrans

Um integron é um sistema típico de captura e disseminação de genes. Podem estar presentes no cromossomo ou em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, agindo como importante mecanismo de transferência de genes, facilitando a transferência horizontal de genes de resistência (CHEN et al., 2015). A estrutura de qualquer integron inclui uma plataforma estável e uma matriz variável. A plataforma contém um gene que codifica a integrase (*intI*), um sítio recombinante para a integração de cassetes (*attI*) e um promotor (PC) que é orientado para o ponto de integração e dirige a expressão de cassetes (MAZEL et al., 2015).

A integrase, uma tirosina recombinase, pode recombinar discretas unidades de DNA circular conhecidos como cassette gênicos. Cinco classes de integrans de resistência já foram definidas a partir de sequências da proteína integrase e três destas são responsáveis por disseminar multirresistência (MAKOWSKA; KOCZURA; MOKRACKA, 2016). Estudos anteriores tem encontrado integrans de classe 1 em *Aeromonas* spp. carregando vários cassetes de genes de resistência antimicrobiana (DENG et al., 2016).

Plasmídeos

Os plasmídeos são DNA extracromossômicos circulares ou lineares que podem ser transmitidos por conjugação e se disseminar entre as bactérias agindo como veículo de patogenicidade e de características ambientais relevantes para a sobrevivência do micro-organismo (SHINTANI; SANCHEZ; KIMBARA, 2015). O papel dos plasmídeos na resistência aos antimicrobianos foi reconhecido pela primeira vez no Japão, onde cepas susceptíveis e multirresistentes foram isoladas do mesmo paciente durante um único episódio de disenteria. Este fato sugeriu que as cepas susceptíveis tornaram-se multirresistentes, não através de sucessivas etapas de mutação, mas sim pela aquisição de determinantes genéticos em uma única etapa (RAMIREZ et al., 2014).

Um rigoroso controle da replicação impede que dois plasmídeos semelhantes sejam propagados de modo estável em uma mesma linhagem celular. Os plasmídeos que compartilham o mesmo sistema de replicação são incompatíveis, enquanto os que compartilham sistemas diferentes são compatíveis. Este fenômeno é denominado incompatibilidade de plasmídeos (CARATTOLI, 2013).

A classificação dos plasmídeos tem sido baseada na incompatibilidade desde 1970. Existem 27 grupos de incompatibilidade (Incs) na família Enterobacteriaceae, 14 grupos em *Pseudomonas*, e aproximadamente 18 entre as cepas de *Staphylococcus* (SHINTANI; SANCHEZ; KIMBARA, 2015). Uma ferramenta amplamente utilizada para tipagem de plasmídeos é a tipagem por replicon utilizando um método baseado em Polymerase Chain Reaction-PCR (PRBT). O protocolo original detecta 18 tipos de replicons, mas há kits comerciais com a capacidade de detectar 25 tipos (BROLUND & SANDEGREN, 2016).

Aeromonas spp. muitas vezes carregam plasmídeos de resistência pertencentes a diferentes grupos de incompatibilidade de enterobactérias. Existem relatos sobre a presença dos IncA/C (*A. hydrophila* e *A. salmonicida*), IncU (*A. hydrophila* e *A. salmonicida*, *A. puntacta* e *A. allosaccharophila*, IncQ (*A. hydrophila* e *A. salmonicida*), IncF (*A. caviae*), IncI (*Aeromonas* spp.) e *colE*-type (*A. salmonicida*) (PIOTROWSKA & POPOWSKA, 2015). Recentemente, a presença do grupo IncK também foi demonstrado em uma cepa de *A. hydrophila* de origem ambiental (TACÃO et al., 2014).

Considerando o exposto, acreditamos que determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos, detectar genes de resistência, integrons e realizar a tipagem de

replicons em cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de origens diversas agregará conhecimento para as medidas de prevenção, controle e contenção deste microrganismo no ambiente hospitalar e comunitário (alimento e água).

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Verificar a prevalência e a caracterização dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de diferentes origens na cidade do Rio de Janeiro.

1.2 Específicos

- a) Avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos através do método de disco-difusão
- b) Determinar fenotipicamente a produção ES β LS para as cepas que apresentarem halos indicativos da produção de ES β LS no teste de disco-difusão (TDD);
- c) Determinar as CIMs de ceftazidima e cefotaxima para aquelas cepas que apresentaram halos indicativos da produção de ES β LS no TDD ;
- d) Investigar a presença de genes de resistência e integrons através de PCR;
- e) Identificar a presença de replicons dos principais grupos de incompatibilidade de plasmídeos em enterobactérias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo longitudinal, observacional e descritivo com cepas bacterianas coletadas entre os anos de 1994 e 2015 provenientes de origem ambiental, clínica e de alimentos. Todas as coletas foram realizadas no município do Rio de Janeiro - RJ e os testes foram desenvolvidos no laboratório 1 da Disciplina de Microbiologia e Imunologia (DIMI) do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro- UERJ.

2.2 Amostras bacterianas

Foram estudadas 46 cepas de *Aeromonas* spp. pertencentes à coleção de amostras bacterianas da disciplina de Microbiologia e Imunologia (DIMI) da FCM/UERJ. Das cepas utilizadas neste trabalho, 18 foram provenientes de espécimes clínicos de pacientes internados no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), coletadas entre os anos de 1994 e 2015 (FREITAS, 1998; PALÚ, 2006), uma do Hospital Federal da Lagoa (2015), oito de queijo minas frescal (ARAÚJO et al., 2002), cinco de alface (SILVA,1999), 11 de águas superficiais da Lagoa Rodrigo de Freitas (TRAJANO,2004) e três de peixes tainha, família Mugilidae, comercializados em feira livre (VIEIRA, 2006) (**Quadro 4**).

2.3 Conservação e condições de cultivo das cepas bacterianas

A coleção de culturas das amostras de *Aeromonas* spp. é formada por cepas mantidas a -70°C em 1 mL de meio *skim milk* (BD, Becton Dickison and Company, New Jersey, EUA) com glicerol a 20% v/v (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil), armazenadas em criotubos (Corning, Nova Iorque, EUA).

Durante o estudo, um estoque das cepas foi armazenado a -20°C , em criotubos (Corning) contendo 1 mL de meio *Tryptic Soy Broth without Dextrose* [TSB (BD)] acrescidos de 20% de glicerol v/v (Reagen) (BEUTLING, 1989). Adicionalmente, outro estoque foi mantido sob refrigeração entre 2°C e 8°C , em tubos de vidro 13 x 100 mm contendo 3 mL de *Tryptic Soy Agar* [TSA (BD)]. As alíquotas mantidas no refrigerador foram utilizadas para a realização dos testes e as amostras a -20°C constituíram um estoque secundário.

2.4 Caracterização fisiológica do gênero *Aeromonas* (FREITAS et al., 1998; MACFADDIN, 1980)

Todas as cepas utilizadas neste estudo foram submetidas aos testes de caracterização fisiológica. Para confirmar a identificação das cepas estudadas foram realizados os testes de citocromo-oxidase, fermentação da glicose, tolerância à concentração de 6% de NaCl, produção de ácidos a partir da fermentação do inositol e produção das enzimas Dnase e catalase das cepas sugestivas isoladas a partir do meio seletivo ágar GSP [glutamato-amido-vermelho de fenol (Merck, Darmstald, Alemanha)].

2.4.1 Plaqueamento seletivo

Antes da realização das provas fisiológicas, as culturas estoque foram transferidas para o meio TSB sem dextrose (BD), incubadas por 24h a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e, em

seguida, semeadas em placas contendo os meios TSA e/ou Mac Conkey Agar (BD), incubadas sob as mesmas condições.

Cerca de 2 a 3 colônias obtidas a partir de meio TSA e/ou Mac Conkey foram semeadas por esgotamento em placas contendo ágar GSP (Merck). As placas foram incubadas por 24h-48h a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após o período de incubação foram selecionadas as colônias que apresentaram cor amarela e halo de hidrólise de amido ao seu redor, presuntivas do gênero *Aeromonas*. As colônias foram repicadas para ágar Nutriente (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h para serem submetidas à identificação fisiológica. A cepa ATCC 7966 (*A. hydrophila*) foi utilizada como controle.

2.4.2 Teste de produção da enzima citocromo-oxidase

Com o auxílio de uma alça descartável estéril, cinco colônias bacterianas de uma cultura recente foram transferidas para um pedaço de papel filtro nº 1 (Whatman, Meidstone, Reino Unido) acondicionado sobre uma placa de Petri e sobre este foram depositadas 2 a 3 gotas de uma solução aquosa do reativo n,n-dimetil-p-fenilenodiamina a 1% (Sigma, St Louis, EUA). O aparecimento de coloração roxa intensa foi indicativo de reação positiva. Controle positivo: ATCC 7966 (*A. hydrophila*); Controle negativo: ATCC 70063 (*K. pneumoniae*).

2.4.3 Teste de oxidação-fermentação da glicose

O meio utilizado para determinar o uso da via oxidativa ou fermentativa da glicose foi o meio de cultura Hugh & Leifson (Merck) suplementado com 1% de glicose (Reagen). As culturas foram repicadas com agulha bacteriológica, descartável e esterilizada em um par de tubos contendo o meio de cultura, sendo adicionados 0,5 mL de óleo mineral esterilizado (Sigma) em apenas um dos tubos. Os tubos foram incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h. A mudança da cor do meio, originalmente verde, para amarelo nos dois tubos foi indicativa de metabolismo fermentativo. Controle para

metabolismo fermentativo: ATCC 7966 (*A. hydrophila*); Controle para metabolismo não fermentativo: ATCC 27853 (*P. aeruginosa*).

Quadro 4 – Origem das cepas de *Aeromonas* spp. utilizadas no estudo (continua)

Cepas	Espécie (nº de cepas)	Origem	Ano
Ac289, Ac314, Ac335, Ac354, Ac390, Ac398, Ac56, Ac62, Ac765, Ac81, Ac943, AcC16	<i>Aeromonas caviae</i> (12)	Fezes diarreicas ou não diarreicas de pacientes pediátricos do Hospital Universitário Pedro Ernesto- (HUPE/UERJ)	1994
Ah10, Ah149, Ah644, Ah8, Ah9	<i>Aeromonas hydrophila</i> (5)		
Ac559	<i>Aeromonas caviae</i> (1)		
Ah650	<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)	Hemocultura de paciente adulto do Hospital da Lagoa	2015
AcTi3	<i>Aeromonas caviae</i> (1)	Peixe tainha (porção inicial interna do intestino ou brânquias) comercializados em feira livre do estado do Rio de Janeiro	2006
AhTb3, AhTb4	<i>Aeromonas hydrophila</i> (2)		

Quadro 4 – Origem das cepas de *Aeromonas* spp. utilizadas no estudo.(continuação)

Cepas	Espécie (nº de cepas)	Origem	Ano
PIR2, PIR3, REB, VS2, VS4, VS5 C2, C3, VP2 VP4, VP5	<i>Aeromonas caviae</i> (6) <i>Aeromonas hydrophila</i> (3) <i>Aeromonas veronii</i> bv <i>sobria</i> (2)	Águas superficiais da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro	2003
AQ28, AQ36, AQ37, AQ30, AQ31, AQ38, AQ34 AQ7	<i>Aeromonas caviae</i> (7) <i>Aeromonas hydrophila</i> (1)	Queijos minas frescal comercializados na cidade do Rio de Janeiro	1999
AV49, AV60, AV27 AV110, AV48	<i>Aeromonas caviae</i> (3) <i>Aeromonas hydrophila</i> (2)	Vegetais não processados comercializados na cidade do Rio de Janeiro	2001

Legenda: Cepas isoladas de fezes: C (fezes não diarreicas); Cepas isoladas de peixes: T (tainha) i (intestino) b (brânquias); Cepas isoladas de água: C (clube Caiçaras) PIR (clube Piraquê) VP (Visconde de Pirajá) REB (Rebouças); Cepas isoladas de alimentos: AQ (queijo), AV (vegetais).

Fonte: A autora, 2016

2.4.4 Teste de halotolerância

As cepas em estudo foram inoculadas em um par de tubos com caldo nutriente (Oxoid). Em um dos tubos foi mantida a concentração de NaCl (Reagen) original do meio (0,5%) e no outro a concentração foi ajustada para 6%. A incubação foi realizada por até 3 dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A turvação do caldo nutriente em ambos os tubos foi indicativa de halotolerância. O crescimento apenas no tubo com menor concentração de sal foi considerado como incapacidade de crescer em 6% de NaCl. A cepa ATCC 7966 (*A. hydrophila*) foi utilizada como controle positivo do teste.

2.4.5 Fermentação do inositol

O teste de produção de ácidos a partir do inositol (Merk) foi realizado em meio de cultura para fermentação de carboidratos [1% de peptona (Oxoid); 0,5% de NaCl (Reagen); 0,3% de extrato de carne (Oxoid); pH $7,0 \pm 0,2$] contendo como indicador de pH o indicador de Andrade. Com o auxílio de uma alça bacteriológica esterilizada o inóculo foi transferido para um tubo com meio base acrescido de inositol (1%) (Merck). A incubação foi realizada por até cinco dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Nos tubos onde a cor do meio permaneceu inalterada, o teste foi considerado negativo para a produção de ácidos a partir do inositol, característico do gênero *Aeromonas*. Controle positivo: ATCC 70063 (*K. pneumoniae*); Controle negativo: ATCC 7966 (*A. hydrophila*).

2.4.6 Teste de produção de Dnase

A produção da enzima Dnase foi avaliada a partir da semeadura em forma circular e densa (*spot*) em placas de Petri contendo meio ágar Dnase (BD), as placas foram incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48h. Para revelar a reação, foi acrescido à cultura uma solução de HCl 1N (Reagen) em quantidade suficiente para cobrir toda a

superfície do meio. A presença nítida de um halo transparente ao redor da colônia foi indicativo da produção da enzima. Controle positivo: ATCC 7966 (*A. hydrophila*); Controle negativo: ATCC 70063 (*K. pneumoniae*).

2.4.7 Teste da catalase

Em uma lâmina de vidro, contendo uma gota de H₂O₂ [peróxido de hidrogênio (Reagen)] a 3% foi adicionada uma colônia bacteriana de crescimento recente. A formação imediata de bolhas foi indicativo de reação positiva para a produção da enzima catalase, como observado na cepa controle positivo ATCC 7966 (*A. hydrophila*).

2.5 **Identificação fisiológica em nível de espécie (JANDA & ABBOTT, 2010; MACFADDIN, 1980)**

Diferenças fisiológicas distinguem as espécies do gênero *Aeromonas*. Para identificação em nível de espécie foram realizados os testes de descarboxilação e deidrolação de aminoácidos, teste de produção de ácidos a partir da arabinose, teste de produção de acetoína ou Voges Proskauer, teste de produção de gás a partir de glicose, teste de hidrólise de esculina, teste de utilização do citrato, teste de produção de indol, motilidade e H₂S. Os testes foram feitos a partir de cultura recente (28°C ± 2°C /24h) obtida em ágar Nutriente (Oxoid).

2.5.1 Teste de descarboxilação e deidrolação de aminoácidos

Os testes de descarboxilação da lisina e ornitina e deidrolação da arginina foram

realizados em base de Möeller (Merck) acrescido do aminoácido correspondente na concentração de 1%. A cultura foi inoculada nos três tubos contendo cada aminoácido individualmente e em um quarto tubo contendo apenas a base de Möeller, isento de aminoácido, utilizado como controle. Em cada tubo foi colocado aproximadamente 0,5 de óleo mineral (Sigma), pois a reação ocorre em anaerobiose. Os tubos foram incubados por até cinco dias a 28° C, com observação diária. A mudança de cor do meio de amarelo para púrpura é indicativo da descarboxilação ou deidrolação do aminoácido. O tubo controle de aspecto turvo e de cor amarela, demonstra que o micro-organismo era viável e que o pH do meio acidificou o suficiente para ativar as enzimas descarboxilases. Controle positivo para lisina: ATCC 70063 (*K. pneumoniae*); Controle negativo para lisina: ATCC 15468 (*A. caviae*); Controle positivo para arginina: ATCC 7966 (*A. hydrohila*); Controle negativo para arginina: ATCC 35624 (*A. veronii*); Controle positivo para ornitina: ATCC 35624 (*A. veronii*); Controle negativo para ornitina: ATCC 7966 (*A. hydrohila*).

2.5.2 Teste de produção de ácidos a partir da Arabinose

O teste de produção de ácidos a partir da arabinose foi realizado em meio de cultura para a fermentação de carboidratos como descrito no item 3.3.5. A arabinose (VETEC) foi utilizada na concentração de 1%. A cultura foi inoculada no tubo contendo o carboidrato com o auxílio de alça bacteriológica esterilizada e incubado por até cinco dias a 28°C ± 2°C. Nos tubos onde a cor rosa intensificou, foi considerada positiva para a fermentação do açúcar. Controle positivo: ATCC 15468 (*A. caviae*); Controle negativo: ATCC 35624 (*A. veronii*).

2.5.3 Teste de produção de acetoína

A detecção de acetilmetilcarbinol (acetoína) ou teste de Voges-Proskauer, foi realizada inoculando-se a cepa teste em meio MR-VP (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil). O

tubo foi incubado por 48h a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e após este período 0,6 mL do reagente Barrit I [solução alcoólica de α -naftol (Merck) a 5%] e 0,2 mL do reagente Barrit II [solução aquosa de KOH a 40% (Merck)] foram adicionados, seguidos de agitação rápida do tubo para a introdução de oxigênio atmosférico e possível oxidação da acetoína. A leitura do teste foi realizada 15 a 30 minutos após a adição dos reagentes. O surgimento de um anel de coloração vermelho-cereja na superfície do meio foi indicativo de reação positiva. Controle positivo: ATCC 7966 (*A. hydrophila*); Controle negativo: ATCC 15468 (*A. caviae*).

2.5.4 Teste de produção de gás a partir da glicose

Este teste foi realizado no meio de cultura para a fermentação de carboidratos como descrito no item 2.4.5., suplementado com glicose (Reagen) na concentração de 1%. Um tubo de Durham invertido foi acrescentado ao meio. Os tubos foram semeados e incubados por 48h a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A formação de bolhas no interior do tubo de Durham foi indicativo da produção de gás a partir da fermentação da glicose. Controle positivo: ATCC 7966 (*A. hydrophila*); Controle negativo: ATCC 15468 (*A. caviae*).

2.5.5 Teste de hidrolise de esculina

A partir de um cultivo recente foram realizados inóculos com agulha bacteriológica, descartável e esterilizada, através de picada até o fundo do tubo seguida de semeadura na superfície inclinada do ágar esculina [4% de ágar Columbia (Oxoid); 0,1% de esculina (Merck); 0,05 de citrato férrico (Reagen), pH $7,0 \pm 0,2$]. Os tubos foram incubados por até cinco dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A reação foi considerada positiva quando o meio de cultura passou a apresentar coloração marrom. Controle positivo: ATCC 7966 (*A. hydrophila*); Controle negativo: ATCC 27853 (*P. aeruginosa*).

2.5.6 Teste de utilização do citrato

A semeadura foi realizada no bisel do meio de cultura ágar citrato de Simmons (Himedia, Mumbai, Índia) com o auxílio de alça bacteriológica, descartável e esterilizada. Após a inoculação, o tubo foi incubado por até cinco dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A mudança da cor do meio de verde para azul foi indicativa da utilização do citrato como única fonte de carbono. Controle positivo: ATCC 70063 (*K. pneumoniae*); Controle negativo: ATCC25922 (*E.coli*).

2.5.7 Teste de produção de indol, motilidade e H₂S

Estes testes foram realizados em conjunto, utilizando-se o meio SIM (KASVI, Paraná, Brasil). A cepa foi inoculada no meio de cultura com auxílio de agulha bacteriológica até um terço da coluna de meio. A incubação foi realizada por 48h a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A observação da produção de indol foi feita a partir da adição de cinco gotas do reativo de Kovacs (Newprov, Paraná, Brasil) e a formação de um anel avermelhado na superfície do meio foi indicativo de reação positiva. O crescimento da cultura em toda a coluna do meio, e não apenas na área de inoculação, foi o critério utilizado para avaliar a motilidade do micro-organismo. A produção de H₂S foi identificada pelo escurecimento do meio. Controle positivo para indol e motilidade: ATCC 7966 (*A. hydrophila*); Controle negativo para H₂S, indol e motilidade, ATCC 70063 (*K. pneumoniae*).

2.6 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Aeromonas* spp. por teste de disco-difusão (CLSI, 2010, 2015)

2.6.1 Preparo do inóculo

Cerca de quatro a cinco colônias de cultura pura foram suspensas em solução salina estéril [NaCl (Reagen) 0,9%] até se obter densidade ótica correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A densidade ótica foi obtida através do colorímetro WPA modelo CO-7500 (Biochrom, Cambourne, Reino Unido). As colônias foram provenientes de cultivo recente em ágar Nutriente (Oxoid), após incubação por 24h a $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

2.6.2 Teste de disco-difusão (TDD)

Um *swab* (Copam, Murrieta, USA) esterilizado foi embebido na suspensão bacteriana preparada anteriormente, o excesso foi retirado na parede do próprio tubo. Em seguida, a suspensão foi semeada por toda a superfície da placa contendo o meio de cultura ágar Müeller Hinton (BD), em três planos, de maneira uniforme, para obtenção de crescimento confluinte. Os discos contendo os antimicrobianos foram colocados sobre a superfície do meio com o auxílio de uma pinça flambada e resfriada.

Antes da realização da prova, as placas e os discos de antimicrobianos foram mantidos fora da refrigeração por aproximadamente 1h, até atingirem a temperatura ambiente. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16 às 18h e os halos de inibição medidos e comparados com a tabela de referência do CLSI (2006) e classificados como sensíveis, intermediários ou resistentes. As cepas que apresentaram halo de inibição na categoria intermediária aos antimicrobianos foram consideradas resistentes. As estirpes que demonstraram resistência a três classes de antimicrobianos foram denominadas multirresistentes (MAGIORAKOS et al., 2012).

As cepas ATCC25922 (*Escherichia coli*), ATCC35218 (*E. coli*) e ATCC 27853 (*Pseudomonas aeruginosa*) foram utilizadas como controle da concentração das drogas nos discos de antimicrobianos, beta-lactâmico/inibidor de beta-lactamases e carbapenemas, respectivamente.

2.6.3 Antimicrobianos

A susceptibilidade das cepas de *Aeromonas* spp. aos antimicrobianos (Oxoid) foi determinada pela medida do halo de inibição do crescimento em torno dos discos contendo: Amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 μ g), Ampicilina/Sulbactam (10/10 μ g), Piperaciclina/Tazobactam (100/10 μ g), Cefepime (30 μ g), Cefotaxima (30 μ g), Cefoxitina (30 μ g), Ceftazidima (30 μ g), Ceftriaxona (30 μ g), Ertapanem (10 μ g), Imipenem (10 μ g) (IPM), Meropenem (10 μ g) Aztreonam (30 μ g), Amicacina (30 μ g), Gentamicina (10 μ g), Tetraciclina (30 μ g), Sulfametoxazol/Trimetropim (1,25/23,15 μ g), Ciprofloxacina (5 μ g), Norfloxacina (10 μ g) e Cloranfenicol (30 μ g). Esses antimicrobianos são os preconizados pelo CLSI (2010).

2.7 Detecção fenotípica de beta-lactamases de espectro ampliado (ES β LS)

Não há padronização para a pesquisa de ES β LS em *Aeromonas* spp. O teste foi realizado segundo as recomendações estabelecidas pelo CLSI (2015) para enterobactérias (*K.pneumoniae*, *Klebsiela oxytoca* e *E.coli*). As cepas que apresentaram triagem positiva para produção de ES β L, isto é, halo de inibição \leq 22 mm para ceftazidima (30 μ g) e/ou 27 mm para aztreonam (30 μ g) e/ou \leq 27 mm para cefotaxima (30 μ g) e/ou \leq 25 para ceftriaxona (30 μ g) no teste de disco-difusão disco-difusão, foram submetidas ao teste de detecção fenotípica da produção de ES β LS. A expressão de ES β LS foi demonstrada pelo teste de sinergismo do duplo disco (DDST) (JARLIER et al., 1988) em placas contendo ágar Müeller-Hinton (BD) e aplicando discos (OXOID) contendo cefotaxima (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g) e aztreonam (30 μ g) distantes 25mm (centro a centro) de um disco contendo amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 μ g). O preparo do inóculo e a execução do teste foram realizados de acordo com os procedimentos descritos nos itens 2.5.1 e 2.5.2.

As cepas ATCC25922 (*E. coli*) e ATCC 70063 (*Klebsiela pneumoniae*) foram utilizadas como controle do teste.

2.8 Determinação da concentração inibitória mínima (CLSI 2015)

A concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos ceftazidima (Sigma) e cefotaxima (Sigma) foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do CLSI (2015) para as cepas que apresentaram triagem positiva para a produção de ESβLs no TDD. Ou seja, a determinação da CIM de ceftazidima foi realizada para as cepas que apresentaram halo de inibição ≤ 22 mm no TDD para ceftazidima. Para cefotaxima, foram selecionadas as que apresentaram halo ≤ 27 mm para o respectivo antimicrobiano

2.8.1 Soluções estoque dos sais de antimicrobianos

As soluções estoque foram preparadas de acordo com as normas estabelecidas pelo CLSI (2015), aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência } (\mu\text{g/mg})} \dots\dots\dots(1)$$

2.8.2 Preparo da suspensão bacteriana

A suspensão bacteriana foi preparada em solução salina estéril 0,9% [NaCl (Reagen)] a partir de uma cultura de crescimento em 24h a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em ágar Nutriente (Oxoid). A turbidez da solução foi comparada ao padrão 0,5 da escala de MacFarland (1×10^8 UFC/mL). Em seguida, 100μL da suspensão foram diluídos em 900 μL de solução salina 0,9%.

2.8.3 Diluição do antimicrobiano

Em um tubo estéril de 16x100 mm foram adicionados 5mL de caldo Mueller Hinton (Oxoid), previamente ajustado com os cátions Mg^{++} e Ca^{++} (CAMHB), e 128 μ L da solução estoque do antimicrobiano. Em seguida, 200 μ L dessa solução foram transferidos para os poços da primeira coluna de uma placa de microdiluição, nas demais colunas, foram adicionados apenas 100 μ L de caldo Müller Hinton.

Para a diluição seriada, 100 μ L dos poços da primeira coluna foram transferidos para a coluna posterior e assim sucessivamente, exceto para a última coluna que continha apenas o caldo, utilizada como controle do crescimento microbiano. Foram utilizadas as seguintes concentrações decrescentes de antimicrobiano: 256 μ g/mL, 128 μ g/mL, 64 μ g/mL, 32 μ g/mL, 16 μ g/mL, 8 μ g/mL, 4 μ g/mL, 2 μ g/mL, 1 μ g/mL, 0,5 μ g/mL e 0,25 μ g/mL.

2.8.4 Inoculação em placas para microdiluição

Em cada poço da microplaca foram adicionados 5 μ L de suspensão bacteriana 1:10. . As placas foram incubadas em $35\pm 2^{\circ}C$ por 18h às 24h e a leitura foi realizada considerando o primeiro poço onde não houve crescimento. Os critérios de leitura e interpretação obedeceram às orientações descritas no CLSI (2015). O teste foi aplicado em duplicata e o resultado foi a média aritmética dos valores obtidos.

2.9 Detecção de genes de resistência

A presença dos genes de resistência foi revelada pela aplicação da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.9.1 Extração do DNA por lise térmica

O DNA bacteriano foi extraído por lise térmica. As amostras de *Aeromonas* spp. foram semeadas em ágar Nutriente (Oxoid) e incubadas por 24h a 28°C ± 2°C. Suspensões bacterianas foram preparadas em 100 µL de água mili-Q estéril. Em seguida foram submetidas a uma temperatura de 95°C durante 10 minutos e após esse tempo foram imediatamente congeladas a -20°C por 10 minutos. Para a amplificação dos genes, os lisados foram descongelados, homogeneizados e centrifugados. Apenas o sobrenadante foi utilizado.

2.9.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para as cepas que apresentaram triagem positiva de produção de ESβLs no TSA, foram pesquisados os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1-Like}, *bla*_{CTX-M} grupos 1, 2, 9 e 8/25, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER} e *bla*_{GES} (DALLENE et al., 2010). Os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *qepA* foram investigados nas cepas resistentes às quinolonas e fluoroquinolonas (CATTOIR et al., 2007; MINARINI et al., 2008), os *tetA*, *tetB* e *tetG* para resistência à tetraciclina e os genes *cata*, *cmLA* e *floR* para o clorafenicol. A presença dos genes *sulI*, *sul 2* e integrase de classe 1 (*intl1*) (ANTUNES; MACHADO; PEIXE, 2006) foi avaliada nas cepas resistentes aos antimicrobianos inibidores da via do folato (sulfametoxazol/trimetoprim). Para as cepas que apresentaram o gene da integrase classe 1 (*intl1*) foi realizada a pesquisa de integrons de classe 1 (ANTUNES; MACHADO; PEIXE, 2006). Como controle das reações foram utilizadas cepas previamente sequenciadas pertencentes à DIMI/FCM - UERJ.

2.9.3 Eletroforese em gel de agarose 2%

Os produtos da PCR obtidos foram aplicados em gel de agarose a 2% (Invitrogen) cobertos com tampão TBE [Tris/Borato/EDTA (Tris, Califórnia, USA)], ácido bórico (Reagen, Rio de Janeiro), EDTA (Invitrogen) pH 8,0] e submetidos à corrida

eletroforética por 1h a 100v. O marcador de peso molecular utilizado foi o 100bp DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram visualizados por transiluminação UV (UVP, Upland, Califórnia) e as imagens foram captadas por uma câmera digital (Canon, Tóquio, Japão).

2.10 Tipagem baseada nos replicons dos principais grupos de incompatibilidade de plasmídeos em enterobactérias

As cepas de *Aeromonas* spp. que apresentaram genes de resistência na PCR foram submetidas ao ensaio de PCR para a tipagem baseada nos replicons dos principais grupos de incompatibilidade de plasmídeos em enterobactérias: (CARATTOLI et al., 2005). O DNA extraído foi submetido à amplificação em um termociclador PCT-100® (Thermal Cycler Operations Manual, MJ Research, Inc. USA). As reações foram realizadas em microtubos de 200 µL e nestes, foram adicionados tampão de reação [*Green GoTaq® Flexi Buffer 5X* (Promega, Wisconsin, USA)], cloreto de magnésio [*MgCl₂MgCl₂ Solution 25mM* (Promega)], desoxiribonucleotídeos [dNTP 100 mM (Promega)], oligonucleotídeos [100 Mm (Invitrogen, Califórnia, USA)], taq DNA polimerase [*GoTaq® DNA Polymerase 5u/µL* (Promega)] e água mili-Q estéril. A quantidade de reagentes foi definida para um volume de 50 µL e ajustada para a concentração final desejada em cada reação (**Quadro 5**).

Como controles positivos foram utilizadas cepas previamente sequenciadas para os replicons em estudo, pertencentes à DIMI da FCM – UERJ. Como controle negativo, foi utilizada água mili-Q estéril.

Os géis foram visualizados como descrito no item 2.9.3.

Quadro 5 — Descrição dos iniciadores, sequências nucleotídicas, reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado nas diferentes PCR. (continua)

Objetivo	Iniciadores	Tamanho do Produto (pb)	Sequências 5' -3'	Reagentes	Condições de Amplificação
Pesquisa de genes de resistência aos β -lactâmicos (DALLENE <i>et al.</i> , 2010)	TEM incluindo variantes TEM-1 e TEM-2	800	F CATTTCGGTGTGCGCCCTTATTC R CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	Tampão: 1x MgCl ₂ : 1,5 mM dNTP: 200 μ M 0,4 pmol/ μ L de cada iniciador Taq: 1U DNA 2 μ L	94°C - 10 min (1 ciclo); 94°C - 40s 69°C - 40s 72°C - 1min (30 ciclos); 72°C - 7min (1 ciclo)
	SHV incluindo variantes SHV-1	713	F AGCCGCTTGAGCAAATTAAC R ATCCCGCAGATAAATCACCAC		
	OXA-1, OXA-4 E OXA-30	564	F GGCACCAGATTCAACTTTCAAG R GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG		
	CTX-M grupo 1 incluindo CTX-M1, CTX-M3 e CTX-M15	688	F TTAGGAARTGTGCCGCTGYA ^b R CGATATCGTTGGTGGTRCCAT ^b		
	CTX-M grupo 1 incluindo CTX-M2	404	F CGTTAACGGCAGATGAC R CGATATCGTTGGTGGTRCCAT ^b		
	CTX-M grupo 9 incluindo CTX-M9 e CTX-M14	561	F TCAAGCCTGCCGATCTGGT R TGATTCTCGCCGCTGAAG		
	CTX-M grupo 8/25	326	F AACRCRCAGACGCTCTAC ^b R TCGAGCCGGAASGTGTYAT ^b		

Quadro 5— Descrição dos iniciadores, sequências nucleotídicas, reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado nas diferentes PCR. (continuação)

Objetivo	Iniciadores	Tamanho do Produto (pb)	Sequências 5' -3'	Reagentes	Condições de Amplificação
Pesquisa de genes de resistência aos β -lactâmicos (DALLENNE et al., 2010)	GES -1 A GES-9 e GES 11	399	F AGTCGGCTAGACCGGAAAG R TTTGTCCGTGCTCAGGAT	Tampão:1x MgCl ₂ : 1,5 mM dNTP: 200 μ M 0,3 pmol/ μ L de cada iniciador Taq:1U DNA 2 μ L	94°C -10min (1 ciclo); 94°C - 40s 69°C - 40s 72°C-1min (30 ciclos); 72°C-7min (1 ciclo)
	PER-1 e PER 3	520	F GCTCCGATAATGAAAGCGT R TTCGGCTTGACTCGGCTGA		
	VEB-1 a VEB-6	648	F CATTTCGCGATGCAAAGCGT R CGAAGTTTCTTTGGACTCTG		
Pesquisa de genes de resistência às quinolonas (CATTOIR et al, 2007; MINARINI et al., 2008)	<i>qnrA1 a qnrA6</i>	580	F AGAGGATTTCTCACGCCAGG R TGCCAGGCACAGATCTTGAC	Tampão:1x MgCl ₂ : 1,5 mM dNTP: 200 μ M 20 pmol de cada iniciador Taq: 2,5U DNA 2 μ L	95°C -10min (1ciclo); 95°C-1min 54°C-1min 72°C-1min (35 ciclos); 72°C-10min (1 ciclo)
	<i>qnrB1 a qnrB6</i>	264	F GGMATHGAAATTCGCCACTG R TTTGTCYGYCGCCAGTCGAAc		
	<i>qnrS1 a qnrS2</i>	428	F GCAAGTTCATTGAACAGGGT R TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
	<i>qepA</i>	403	F CGTGTTGCTGGAGTTCTTC R CTGCAGGTA CTGCGTCATG		

Quadro 5— Descrição dos iniciadores, seqüências nucleotídicas, reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado nas diferentes PCR. (continuação)

Objetivo	Iniciadores	Tamanho do produto (pb)	Seqüências 5' -3'	Reagentes	Condições de Amplificação
Pesquisa de genes de resistência às sulfonamidas (ANTUNES; MACHADO; PEIXE, 2006)	<i>sul1</i>	433	F CGGCGTGGGCTACCTGAACG R GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	Tampão: 1x MgCl ₂ : 1,5 mM dNTP: 200µM 0,2µM de cada iniciador Taq: 0,5U DNA: 2 µL	94°C -5min (1ciclo); 94°C-30s, 69°C-30s, 72°C-1min, (30 ciclos); 72°C-8 min (1 ciclo)
	<i>sul2</i>	293	F GCGCTCAAGGCAGATGGCATT R GCGTTTGATACCCGCACCCGT		
	<i>intl1</i>	898	F GCCACTGCGCCGTTACCACC R GGCCGAGCAGATCCTGCACG		
Pesquisa de integron de classe 1 (ANTUNES; MACHADO; PEIXE, 2006)	CS	Variável	5' GGCATCCAAGCAGCAGCAAG 3' AAGCAGACTTGACCTGA	Tampão: 1x MgCl ₂ : 1,5 mM dNTP: 200 µM 0,3µM de cada iniciador Taq: 1U DNA 2 µL	94°C -5min (1ciclo); 94°C- 1min, 53°C- 1min, 72°C-6min (35 ciclos); 72°C-16min (1 ciclo)

Quadro 5— Descrição dos iniciadores, sequências nucleotídicas, reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado nas diferentes PCR. (continuação)

Objetivo	Iniciadores	Tamanho do Produto (pb)	Sequências 5' -3'	Reagentes	Condições de Amplificação
Pesquisa de genes de resistência à tetraciclina (ANTUNES; MACHADO; PEIXE, 2006)	<i>tetA</i>	210	F GCTACATCCTGCTTGCCT R CATAGATCGCCGTGAAGA	Tampão: 1x MgCl ₂ : 1,5mM dNT: 200µM 0,2µM de cada iniciador Taq: 0,5U DNA 2 µL	94°C -5min (1 ciclo); 95°C-30s, 55°C-30s, 72°C-1min , (30 ciclos); 72°C-8 min (1 ciclo)
	<i>tetB</i>	600	F TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG R GTAATGGGCCAATAACACCG		
	<i>tetG</i>	500	F GCTCGGTGGTATCTCTGC R AGCAACAGAATCGGGAAC		
Pesquisa de genes de resistência ao cloranfenicol (ANTUNES; MACHADO; PEIXE, 2006)	<i>catA</i>	623	F CCACCGTTGATATATCCC R CCTGCCACTCATCGCAGT	Tampão: 1x MgCl ₂ : 1,5mM dNT: 200µM 0,2µM de cada iniciador Taq: 0,5U DNA 2 µL	94°C -5min (1 ciclo); 95°C-30s, 55°C-30s, 72°C-1min (30 ciclos); 72°C-8 min (1 ciclo)
	<i>cmlA</i>	435	F TGTCATTTACGCCATACTCG R ATCAGGCATCCCATTCCCAT		
	<i>floR</i>	868	F CACGTTGAGCCTCTATAT R ATGCAGAAGTAGAACGCG		

Quadro 5— Descrição dos iniciadores, sequências nucleotídicas, reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado nas diferentes PCR. (continuação)

Objetivo	Iniciadores	Tamanho do Produto (pb)	Sequências 5' -3'	Reagentes	Condições de Amplificação
Tipagem baseada nos replicons dos principais grupos de incompatibilidade em plasmídeos em enterobactérias (CARATTOLI et al., 2005)	HI1	471	F GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC R TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	Tampão: 1x MgCl ₂ : 1,5 mM dNTP: 200 μM 20pmol de cada iniciador Taq: 2,5U DNA 2 μL	94°C -5min (1 ciclo); 94°C-1min 60°C-30s 72°C-1min (30 ciclos); 72°C-5 min (1 ciclo)
	HI2	644	F TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC R GGCTCACTACCGTTGTCATCCT		
	II	139	F CGAAAGCCGGACGGCAGAA R TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
	X	376	F AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT R TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC		
	L/M	785	F GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG R TGCAGGGGCGATTCTTTAGG		
	N	559	F GTCTAACGAGCTTACCGAAG R GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		

Quadro 5 — Descrição dos iniciadores, sequências nucleotídicas, reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado nas diferentes PCR. (continuação)

Objetivo	Iniciadores	Tamanho do Produto (pb)	Sequências 5' -3'	Reagentes	Condições de Amplificação
Tipagem baseada nos replicons dos principais grupos de incompatibilidade em plasmídeos em enterobactérias (CARATTOLI et al., 2005)	FIA	462	F CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG R GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	Tampão: 1x MgCl ₂ : 1,5 mM dNTP: 200 µM 20pmol de cada iniciador Taq: 2,5U DNA 2 µL	94°C -5min (1 ciclo); 94°C-1min 60°C-30s 72°C-1min (30 ciclos); 72°C-5 min (1 ciclo)
	FIB	702	F GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG R CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT		
	W	242	F CCTAAGAACAACAAGCCCCCG R GGTGCGCGGCATAGAACCGT		
	Y	765	F AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG R GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT		
	P	534	F CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA R TCACGCGCCAGGGCGCAGCC		
	FIC	262	F GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG R TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT		

Quadro 5— Descrição dos iniciadores, sequências nucleotídicas, reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado nas diferentes PCR (conclusão)

Objetivo	Iniciadores	Tamanho do Produto (pb)	Sequências 5' -3'	Reagentes	Condições de Amplificação
Tipagem baseada nos replicons dos principais grupos de incompatibilidade em plasmídeos em enterobactérias (CARATTOLI et al., 2005)	A/C	465	F GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA R ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	Tampão 1x MgCl ₂ 1,5 mM dNTP 200 µM 20pmol de cada iniciador Taq 2,5U DNA 2 µL	94°C -5min (1 ciclo); 94°C-1min 60°C-30s 72°C-1min (30 ciclos); 72°C-5 min (1 ciclo)
	T	750	F TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT R CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC		
	FII _s	270	F CTGTTCGTAAGCTGATGGC R CTCTGCCACAACTTCAGC		
	FrepB	270	F TGATCGTTTAAGGAATTTTG R GAAGATCAGTCACACCATCC		
	K	160	F GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC R TCTTTCACGAGCCCGCCAAA		
	B/O	159	R TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA		

Legenda:M=adenina ou citosina; H=adenina ou citosina ou timina; Y= citosina ou timina; R=adenina ou guanina; k=guanina ou timina; S=guanina ou citosina.

Fonte:A autora, 2016

3 RESULTADOS

3.1 Identificação

As cepas selecionadas foram confirmadas como sendo do gênero *Aeromonas*. Das 46 cepas avaliadas, 30 foram identificadas como *A. caviae* (n=13, origem humana; n=1, peixes; n=6, água; n=7, queijo e n=3, vegetais), 14 foram classificadas como sendo da espécie *A. hydrophila* (n=6, origem humana; n=2, peixes, n=3, água; n=1, queijo; n=2, vegetais) e apenas 2 cepas foram identificadas como *A. veronii* bv *sobria*, ambas de origem aquática (n=2, água). O resultado da caracterização fisiológica das cepas está descrito no **Quadro 6**.

3.2 Teste de disco-difusão e detecção fenotípica de ESβLs

O maior percentual de resistência, incluída a categoria intermediária, foi observado para a ampicilina/sulbactam (71,7%), seguido pela ceftazidima (32,6%), amoxicilina/ácido clavulânico (30,4%), cefotaxima (21,7%), cefepime (19,6%) e tetraciclina (19,6%) (**Gráfico 1**). Todas as cepas foram susceptíveis à ciprofloxacina, gentamicina, ampicilina, cefepime e aztreonam (**Gráfico 1**). Doze cepas (26,1%) apresentaram resistência, incluída a categoria intermediária, a pelo menos três classes de antimicrobianos, sendo consideradas multirresistentes. Uma cepa (Ac559), de origem clínica, foi resistente a todos os carbapanêmicos (**Gráfico 1**).

Quadro 6 — Resultado dos testes de caracterização fisiológica das 46 cepas de *Aeromonas* spp.(continua)

		Testes															Identificação	
	Cepas	OF	Oxi	Cat	Ino	NaCl	Gás	LDC	ADC	ODC	Esc	H2S	Ind	Mot	Cit	Arab		VP
1	Ac289	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>A. caviae</i>
2	Ac314	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>A. caviae</i>
3	Ac335	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
4	Ac354	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>A. caviae</i>
5	Ac390	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
6	Ac398	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
7	Ac56	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>A. caviae</i>
8	Ac62	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
9	Ac765	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>A. caviae</i>
10	Ac81	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
11	Ac943	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>A. caviae</i>
12	Ac559	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
13	AcC16	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>A. caviae</i>
14	Ah10	F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	<i>A. hydrophila</i>
15	Ah149	F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	<i>A. hydrophila</i>
16	Ah644	F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	<i>A. hydrophila</i>
17	Ah8	F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	<i>A. hydrophila</i>
18	Ah9	F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	<i>A. hydrophila</i>
19	Ah650	F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	<i>A. hydrophila</i>
20	AcTi3	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
21	AhTb3	F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	<i>A. hydrophila</i>
22	AhTb4	F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	<i>A. hydrophila</i>
23	AcPIR2	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
24	AcPIR3	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>A. caviae</i>
25	AcREB	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>A. caviae</i>

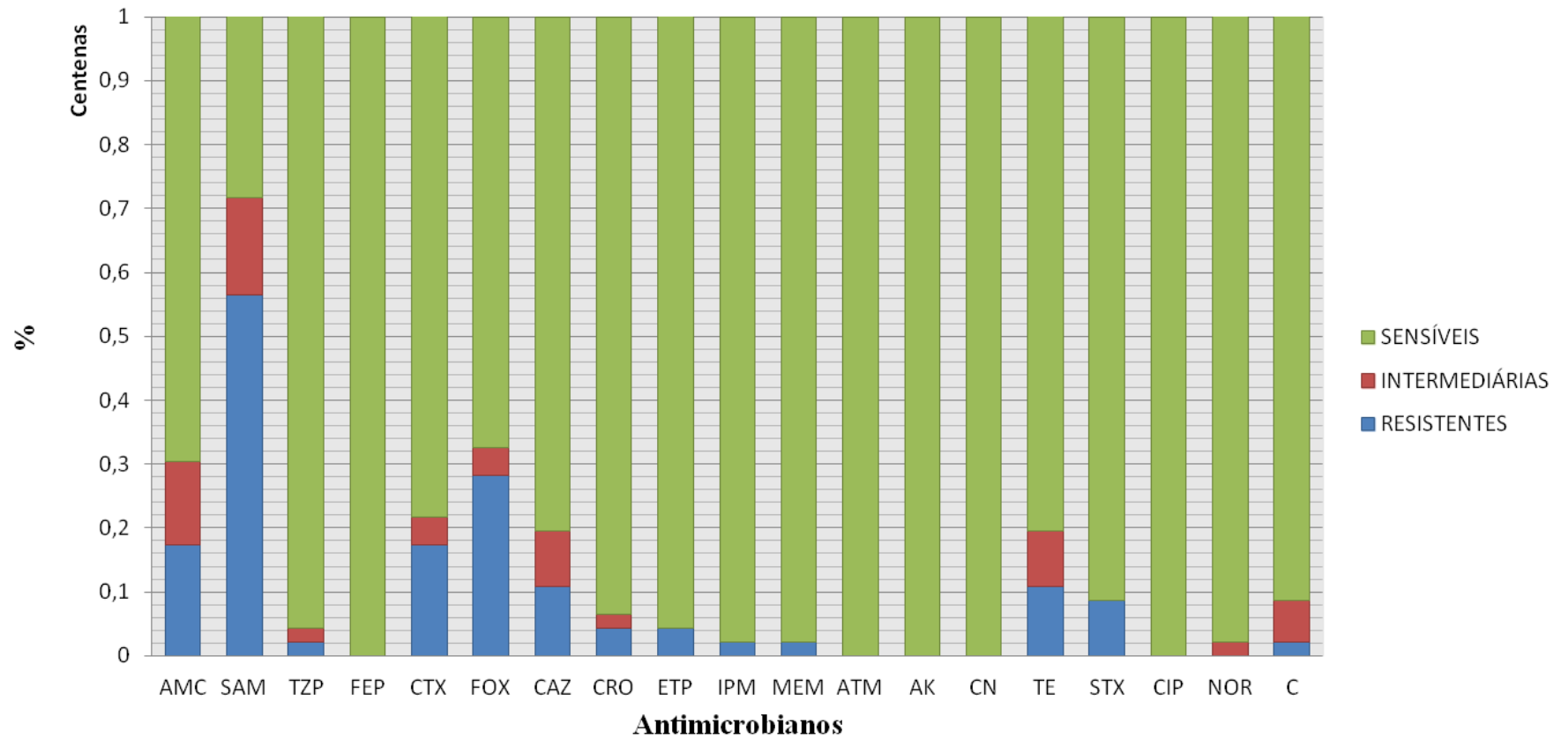
Quadro 6 — Resultado dos testes de caracterização fisiológica das 46 cepas de *Aeromonas* spp.(conclusão)

	Cepas	Testes															Identificação	
		OF	Oxi	Cat	Ino	NaCl	Gás	LDC	ADC	ODC	Esc	H ₂ S	Ind	Mot	Cit	Arab		VP
26	AcVS2	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
27	AcVS4	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
28	AcVS5	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
29	AhC2	F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	<i>A.hydrophila</i>
30	AhC3	F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	<i>A.hydrophila</i>
31	AhVP2	F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	<i>A. hydrophila</i>
32	AvsVP4	F	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i>
33	AvsVP5	F	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i>
34	AcAQ28	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>A. caviae</i>
35	AcAQ36	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
36	AcAQ37	F	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
37	AcAQ30	F	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>A. caviae</i>
38	AcAQ31	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
39	AcAQ38	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
40	AcAQ34	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
41	AhAQ7	F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	<i>A.hydrophila</i>
42	AcAV49	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>A. caviae</i>
43	AcAV60	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
44	AcAV27	F	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>A. caviae</i>
45	AhAV110	F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	<i>A.hydrophila</i>
46	AhAV48	F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	<i>A.hydrophila</i>

Legenda: OF-fermentação da glicose; Oxi-Oxidase; Cat-Catalase; Ino-inositol; NaCl- halotolerância; Gás-produção de gás a partir da glicose; LDC- lisina descarboxilase; ADC-Arginina diidrolase; ODC-Ornitina descarboxilase; Esc- hidrólise da esculina; H₂S-Produção de H₂S; Ind-indol; Mot-Motilidade; Cit-Citrato de Simmons; Arab-Fermentação da arabinose; VP- Voges Proskauer;; F-fermentador; -*Aeromonas caviae*; Ah- *Aeromonas hydrophila*; Avs- *Aeromonas veronii* bv. *sobria*.

Fonte: A autora, 2016

Gráfico 1— Percentual de susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de diferentes origens



Legenda: AMC -Amoxaxilina/ácido clavulânico, SAM -Ampicilina/Sulbactam, TZP- Piperaciclina/Tazobactam, , FEP- Cefepime, CTX-Cefotaxima, FOX- Cefoxitina, CAZ- Ceftazidima, CRO-Ceftriaxona, ETP- Ertapanem, IPM- Imipenem, MEM- Meropenem, AZT -Aztreonam, AK- Amicacina, CN-Gentamicina, TE- Tetraciclina, STX- Sulfametoxazol/Trimetropim, CIP- Ciprofloxacina, NOR- Norfloxacina, C- Cloranfenicol.

Fonte: A autora, 2016

Todas as espécies de *Aeromonas* spp. apresentaram maior frequência de resistência para a ampicilina/sulbactam, sendo o maior percentual de resistência observado nas cepas de *A. veronii* bv. *sobria* em que 100% (n= 2) das cepas foram resistentes a esse antimicrobiano, seguido por *A. hydrophila* (92,9%; n=13) e *A. caviae* (60%; n= 18) (**Tabela 1**). A taxa de resistência apresentada por *A. hydrophila* aos antimicrobianos cefoxitina (42,9%), ceftazidima (28,6%) e ceftriaxona (14,3%) foi maior do que as observadas em *A. caviae* e *A. veronii* bv. *sobria* (**Tabela 1**). Para a cefalosporina de 3ª geração, cefotaxima, a maior taxa de resistência foi encontrada em *A. caviae*. A espécie também foi a única a apresentar resistência para os carbapenêmicos e para a norfloxacin. Todas as cepas de *A. hydrophila* foram susceptíveis ao sulfametoxazol/trimetoprim (**Tabela 1**). As cepas de *A. veronii* bv. *sobria* (n=2) apresentaram resistência, incluída a categoria intermediária, apenas para os antimicrobianos ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulânico e sulfametaxazol/trimetoprim (**Tabela 1**).

Comparando as taxas de resistência, incluída a categoria intermediária, entre cepas de diferentes origens, foi observado que o percentual de resistência para ampicilina/sulbactam e amoxicilina/ácido clavulânico foi semelhante entre todas as origens (**Tabela 2**). Apenas as cepas de origem clínica apresentaram resistência, incluída a categoria intermediária, aos antimicrobianos piperaciclina/tazobactam, ceftriaxone, ertapenem, imipenem e meropenem (**Tabela 2**). As cepas de origem clínica apresentaram o maior número de marcadores de resistência (13 antimicrobianos em 19 testados) (**Tabela 2**). A resistência, incluída a categoria intermediária, para a norfloxacin foi identificada em apenas uma cepa (AV49), proveniente de alimento (**Tabela 2**).

Foi observada uma grande diversidade de perfis de resistência, 27 perfis em 46 cepas testadas (**Tabela 3**). As cepas Ah650 e Ah8 de origem clínica de dois hospitais diferentes apresentaram resistência concomitante a sete marcadores, de duas classes distintas, β -lactâmicos e tetraciclina (**Tabela 3**). Os perfis de resistência que agregaram cepas foram: AMC, SAM, FOX, CAZ (n=3; 6,5%), que reuniu cepas de *A. hydrophila* isoladas de espécime clínico e peixes comercializados em feira livre; SAM, CTX (n=2; 4,3%), que incluiu cepas de *A. caviae* isoladas de queijo minas frescal; SAM, TE (n=2; 4,3%), perfil exibido por cepas de *A. caviae* isoladas de águas superficiais da Lagoa Rodrigo de Freitas e de vegetais não processados comercializados em feira livre; FOX (n=2; 4,3%), reuniu cepas de *A. caviae* de origem clínica e SAM, perfil mais frequente (n=10; 21,7%), que incluiu cepas das três espécies, com a seguinte distribuição: *A. hydrophila* isoladas de águas superficiais, queijo minas frescal e vegetais não processados (ambiente e alimentos); *A. caviae* isoladas de

espécime clínico e queijo minas frescal; *A.veronii* bv *sobria* isolada de águas superficiais (Tabela 3).

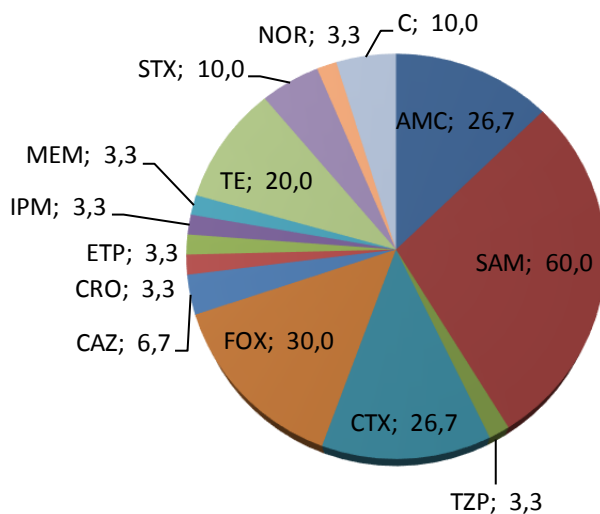
Tabela 1 — Percentuais de susceptibilidade e não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de *Aeromonas* spp. de acordo com a espécie

Antimicrobianos	<i>A. caviae</i> (N=30)			<i>A. hydrophila</i> (N=14)			<i>A. veronii</i> bv. <i>Sobria</i> (N=2)		
	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)
AMC	13,3	13,3	73,3	21,4	14,3	64,3	50	-	50
SAM	46,7	13,3	40	78,6	14,3	7,1	50	50	-
TZP	3,3	-	96,7	-	7,1	92,9	-	-	100
FEP	-	-	100	-	-	100	-	-	100
CTX	20	6,7	73,3	14,3	-	85,7	-	-	100
FOX	23,3	6,7	70	42,9	-	57,1	-	-	100
CAZ	6,7	-	93,3	28,6	21,4	50	-	-	100
CRO	-	3,3	96,7	14,3	-	85,7	-	-	100
ETP	3,3	-	96,7	7,1	-	92,9	-	-	100
IPM	3,3	-	96,7	-	-	100	-	-	100
MEM	3,3	-	96,7	-	-	100	-	-	100
ATM	-	-	100	-	-	100	-	-	100
AK	-	-	100	-	-	100	-	-	100
CN	-	-	100	-	-	100	-	-	100
TE	10	10	80	14,3	7,1	78,6	-	-	100
STX	6,7	3,3	90	-	-	100	-	50	50
CIP	-	-	100	-	-	100	-	-	100
NOR	-	3,3	96,7	-	-	100	-	-	100
C	3,3	6,7	90	-	7,1	92,9	-	-	100

Legenda: R-resistente; I- intermediária; S-Sensível; AMC -Amoxaxilina/ácido clavulânico, SAM- Ampicilina/Sulbactam, TZP- Piperaciclina/Tazobactam, FEP- Cefepime, CTX-Cefotaxima, FOX- Cefoxitina, CAZ-ceftazidima, CRO-Ceftriaxona, ETP- Ertapanem, IPM- Imipenem, MEM- Meropenem, AZT-Aztreonam, AK- Amicacina, CN-Gentamicina, TE- Tetraciclina, STX- Sulfametoxazol/Trimetropim, CIP- Ciprofloxacina, NOR- Norfloxacina, C- Cloranfenicol.

Fonte: A autora, 2016.

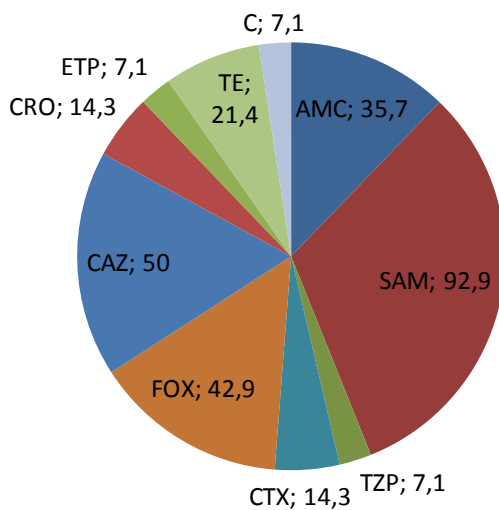
Gráfico 2 — Percentuais de não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de *Aeromonas caviae*



Legenda: AMC -Amoxaxilina/ácido clavulânico, SAM-Ampicilina/Sulbactam, TZP- Piperaciclina/Tazobactam, CTX-Cefotaxima, FOX- Cefoxitina, CAZ-ceftazidima, CRO-Ceftriaxona, ETP- Ertapanem, IPM- Imipenem, MEM- Meropenem, TE- Tetraciclina, STX- Sulfametoxazol/Trimetropim, NOR- Norfloxacin, C- Cloranfenicol.

Fonte: A autora, 2016

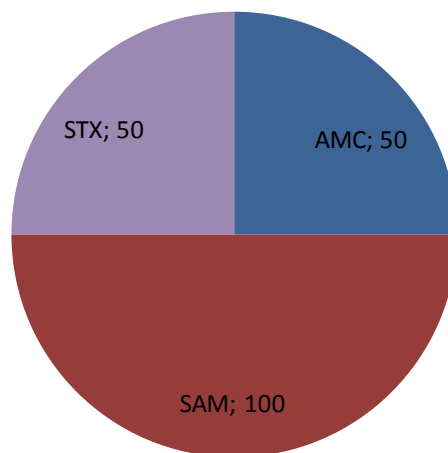
Gráfico 3 — Percentuais de não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de *Aeromonas hydrophila*



Legenda: AMC -Amoxaxilina/ácido clavulânico, SAM-Ampicilina/Sulbactam, TZP- Piperaciclina/Tazobactam, CTX-Cefotaxima, FOX- Cefoxitina, CAZ-ceftazidima, CRO-Ceftriaxona, ETP- Ertapanem, TE- Tetraciclina, C- Cloranfenicol.

Fonte: A autora, 2016

Gráfico 4 — Percentuais de não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de *Aeromonas veronii* bv *sobria*



Legenda: AMC -Amoxaxilina/ácido clavulânico, SAM-Ampicilina/Sulbactam, STX-Sulfametoxazol/Trimetropim.

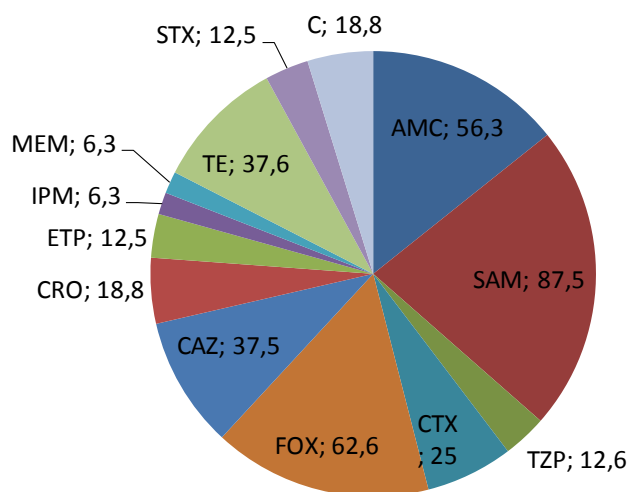
Fonte: A autora, 2016.

Tabela 2 — Percentuais de susceptibilidade e não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de *Aeromonas* spp. de acordo com a origem de isolamento

Antimicrobianos	Cepas clínicas N=16			Cepas de ambiente N=11			Cepas de alimentos N=19		
	R(%)	I(%)	S(%)	R(%)	I(%)	S(%)	R(%)	I(%)	S(%)
AMC	18,8	37,5	43,8	18,2	-	81,8	15,8	-	84,2
SAM	62,5	25,0	12,5	54,5	18,2	27,3	52,6	5,3	42,1
TZP	6,3	6,3	87,5	-	-	100	-	-	100
FEP	-	-	100	-	-	100	-	-	100
CTX	25,0	-	75,0	9,1	9,1	81,8	15,8	5,3	78,9
FOX	56,3	6,3	37,5	18,2	9,1	72,7	10,5	-	89,5
CAZ	12,5	25,0	62,5	9,1	-	90,9	15,8	-	84,2
CRO	12,5	6,3	81,3	-	-	100	-	-	100
ETP	12,5	-	87,5	-	-	100	-	-	100
IPM	6,3	-	93,8	-	-	100	-	-	100
MEM	6,3	-	93,8	-	-	100	-	-	100
ATM	-	-	100	-	-	100	-	-	100
AK	-	-	100	-	-	100	-	-	100
CN	-	-	100	-	-	100	-	-	100
TE	18,8	18,8	62,5	-	9,1	90,9	10,5	-	89,5
STX	12,5	-	87,5	-	18,2	81,8	-	-	100
CIP	-	-	100	-	-	100	-	-	100
NOR	-	-	100	-	-	100	-	5,3	94,7
C	-	18,8	81,3	-	-	100	5,3	-	94,7

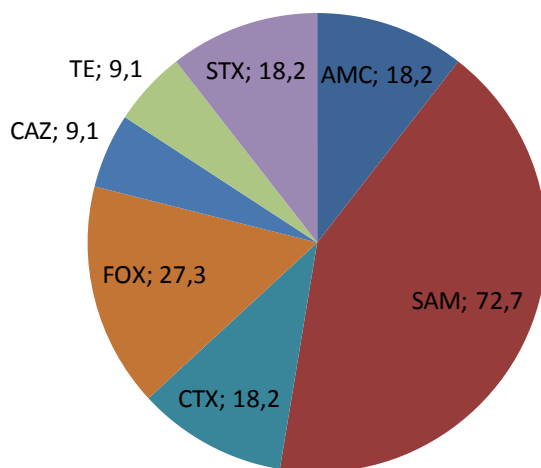
Legenda: R-resistente; I- intermediária; S-Sensível; AMC -Amoxaxilina/ácido clavulânico,SAM Ampicilina/Sulbactam, TZP- Piperaciclina/Tazobactam, FEP- Cefepime, CTX-Cefotaxima, FOX- Cefoxitina, CAZ- Ceftazidima, CRO-Ceftriaxona, ETP- Ertapanem, IPM- Imipenem, MEM- Meropenem,AZT Aztreonam, AK- Amicacina, CN-Gentamicina, TE- Tetraciclina, STX- Sulfametoxazol /Trimetroprim, CIP- Ciprofloxacina, NOR- Norfloxacina, C- Cloranfenicol.

Fonte: A autora, 2016.

Gráfico 5 — Percentuais de não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas clínicas

Legenda: AMC -Amoxicilina/ácido clavulânico, SAM Ampicilina/Sulbactam, TZP- Piperaciclina/Tazobactam, CTX-Cefotaxima, FOX- Cefoxitina, CAZ- Ceftazidima, CRO-Ceftriaxona, ETP- Ertapanem, IPM- Imipenem, MEM- Meropenem, TE- Tetraciclina, STX- Sulfametoxazol /Trimetroprim, C- Cloranfenicol.

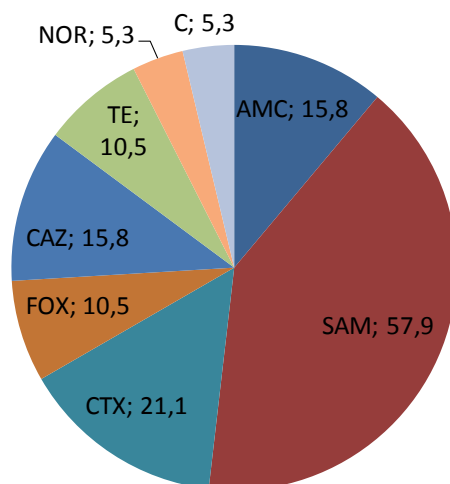
Fonte: A autora, 2016.

Gráfico 6 — Percentuais de não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas ambientais

Legenda: AMC-Amoxicilina/ácido clavulânico, SAM Ampicilina/Sulbactam, CTX-Cefotaxima, FOX- Cefoxitina, CAZ- Ceftazidima, TE- Tetraciclina, STX- Sulfametoxazol /Trimetroprim.

Fonte: A autora, 2016.

Gráfico 7 — Percentuais de não susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas isoladas de alimentos



Legenda: AMC-Amoxicilina/ácido clavulânico, SAM Ampicilina/Sulbactam, CTX-Cefotaxima, FOX-Cefoxitina, CAZ- Ceftazidima, TE- Tetraciclina, NOR- Norfloxacina, C- Cloranfenicol.

Fonte: A autora, 2016

Tabela 3 — Perfis de resistência aos antimicrobianos em cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de diferentes origens

Perfil de resistência	Cepas	Percentual (%) n=46
SAM, CTX, FOX, CAZ, CRO, ETP, TE	Ah650	2,17
AMC, SAM, CTX, FOX, CAZ, CRO, TE	Ah8	2,17
AMC, CTX, FOX, CAZ, STX	REB	2,17
AMC, SAM, FOX, CAZ, TE	Ah149	2,17
AMC, SAM, FOX, CRO, TE	Ac314	2,17
SAM, CTX, ETP, IPM, MEM	Ac559	2,17
AMC, SAM, CAZ, C	Ah10	2,17
AMC, SAM, FOX, CAZ	Ah644, Tb3, Tb4	6,52
AMC, SAM, FOX, TE	Ac289	2,17
AMC, SAM, STX, C	Ac81	2,17
SAM, TZP, FOX, STX	Ac765	2,17
AMC, SAM, C	Ac943	2,17
AMC, SAM, CTX	AcC16	2,17
AMC, SAM, FOX	Ac354	2,17
AMC, SAM, STX	VP4	2,17
CTX, NOR, C	AV49	2,17
SAM, CTX, FOX	VS5	2,17
SAM, CTX, TE	AQ38	2,17
AMC, SAM	AV27	2,17
SAM, CAZ	Ti3	2,17
SAM, CTX	AQ28, AQ31	4,35
SAM, FOX	PIR2	2,17
SAM, TE	PIR3, AV60	4,35
CAZ	Ah9	2,17
FOX	Ac390, Ac56	4,35
SAM	Ac62, C2, C3, VP5, AQ36, AQ37, AQ7, AV110, AQ30, AV48	21,73
TE	Ac335	2,17

Legenda: AMC -Amoxicilina/ácido clavulânico, SAM -Ampicilina/Sulbactam, TZP- Piperaciclina/Tazobactam, FEP- Cefepime, CTX-Cefotaxima, FOX- Cefoxitina, CAZ- Ceftazidima, CRO-Ceftriaxona, ETP- Ertapanem, IPM- Imipenem, MEM- Meropenem, AZT -Aztreonam, AK- Amicacina, CN-Gentamicina, TE- Tetraciclina, STX- Sulfametoxazol /Trimetropim, CIP- Ciprofloxacina, NOR- Norfloxacin, C- Cloranfenicol.

Fonte: A autora, 2016

O teste fenotípico de sinergismo do duplo disco (DDST) foi realizado em 20 cepas que apresentaram diâmetro de halo de inibição presuntivo para a pesquisa de ESβLs para os antimicrobianos ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona e aztreonam (CLSI, 2015). Apenas uma cepa apresentou fenótipo positivo para a produção de ESβL

(*A. caviae* - AcC16, origem clínica), que apresentou resistência à cefotaxima no TDD e na CIM.

3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As cepas selecionadas para a determinação da CIM de cefotaxima e ceftazidima foram as vinte cepas que apresentaram no TDD halos sugestivos para a produção de ESβLs (CLSI, 2015). Houve divergência entre os resultados do teste de disco-difusão e da concentração inibitória mínima em relação à cefotaxima. Dentre as oito cepas que apresentaram resistência no TDD, quatro apresentaram CIM de susceptibilidade e uma CIM de intermediária, apenas em três cepas foram observados resultados coincidentes (**Tabela 4**).

Tabela 4— Determinação da CIM para cefotaxima em cepas de *Aeromonas* spp. (CLSI, 2015)

Cepas	CIM (µg/mL)		TDD (mm)	
Ac765	0,5	Sensível	26	Sensível
Ac559	2	Intermediária	21	Resistente
AcC16	16	Resistente	18	Resistente
Ah8	64	Resistente	12	Resistente
Ah650	64	Resistente	64	Resistente
AcTb4	1	Sensível	26	Sensível
REB	4	Resistente	25	Intermediária
VS5	1	Sensível	21	Resistente
AQ28	0,06	Sensível	16	Resistente
AQ31	0,06	Sensível	16	Resistente
AQ38	1	Sensível	24	Intermediária
AV49	0,5	Sensível	16	Resistente

Legenda: CIM - concentração inibitória mínima; TDD – teste de disco-difusão

Tabela 5 — Determinação da CIM para ceftazidima em cepas de *Aeromonas* spp. (CLSI, 2015)

Cepas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		TDD (mm)	
Ah10	1	Sensível	10	Resistente
Ah149	0,5	Sensível	18	Intermediária
Ah644	0,5	Sensível	16	Resistente
Ah8	64	Resistente	9	Resistente
Ah9	0,5	Sensível	20	Intermediária
Ah650	128	Resistente	14	Resistente
AcTi3	0,5	Sensível	16	Resistente
AhTb3	4	Sensível	15	Resistente
AcTb4	1	Sensível	11	Resistente
REB	0,5	Sensível	12	Resistente

Legenda: CIM - concentração inibitória mínima; TDD – teste de disco-difusão

Quanto aos resultados obtidos para ceftazidima, observamos que somente duas cepas apresentaram resultados coincidentes quanto à resistência no TDD e na determinação da CIM (**Tabela 5**).

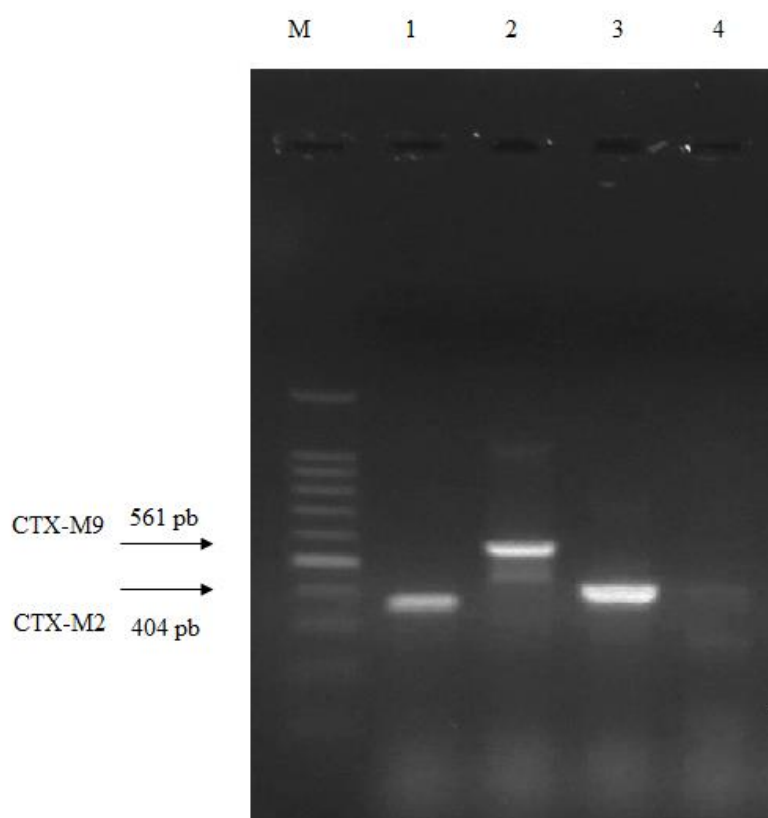
3.4 Detecção de genes de resistência

As cepas incluídas nos critérios de triagem determinados pelo CLSI (2015) para a detecção de ES β Ls, por teste de disco-difusão ou CIM, foram submetidas a PCR para a pesquisa de genes que mais frequentemente codificam estas enzimas. Foi avaliada a presença dos genes TEM, SHV, OXA-1-Like, CTX-M grupos 1, 9 e 8/25, VEB, e PER E GES (DALLENE et al., 2010) para as cepas Ac765, Ac559, AcC16, Ah8, Ah650, Tb4, REB, VS5, AQ28, AQ31, AQ38, AV49 Ac390, Ah10, Ah149, Ah644, Ah9, Ti3, Tb3 e Ac314.

Os genes TEM, SHV, OXA-1-Like, CTX-M grupos 1, 9 e 8/25, VEB, e PER não foram encontrados nas cepas em estudo. Uma cepa de *A. caviae* (AcC16), de origem clínica, apresentou resultado positivo para o gene CTX-M2 (**Figura 1**), resultado compatível com o teste fenotípico confirmatório para a detecção de ES β Ls. Outras duas estirpes, uma *A. caviae* (Ti3) e uma *A. hydrophila* (Tb3), ambas isoladas de

peixes, foram positivas para o gene GES (**Figura 2**). A cepa AhTb3 (**Tabela 5**) foi resistente no TDD e sensível na CIM, assim como a cepa AcTi3 (**Tabela 5**). As cepas não apresentaram resultado fenotípico positivo para a produção de ESβLs (DDST).

Figura 1— Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos da PCR para pesquisa dos genes *bla*_{CTX-M2} e *bla*_{CTX-M9}



Legenda: M-marcador de peso molecular 100pb; Linha 1- *A. caviae* AcC16 (cepa positiva); Linha 2- Controle positivo para CTX-M9 (*E. coli* C049), Linha 3- Controle positivo para CTX-M2 (*E. coli* PR2001); 4- Controle negativo (Mistura da reação).

Fonte: A autora, 2016

Figura 2 — Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos da PCR para a pesquisa do gene *bla_{GES}*



Legenda: M- Marcador de peso molecular 100 pb, Linhas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19 - cepas negativas (*A. caviae* Ac765; *A. hydrophila* Ah8; *A. hydrophila* Tb4 -; *A. caviae* REB; *A. caviae* VS5; *A. caviae* Ac559; *A. caviae* AQ28; *A. caviae* AQ31; *A. caviae* AQ38; *A. caviae* Av49; *A. hydrophila* Ah650; *A. caviae* Ac390; *A. caviae* C16; *A. hydrophila* Ah10; *A. hydrophila* Ah149; *A. hydrophila* Ah644; *A. hydrophila* Ah9; *A. caviae* Ac314, respectivamente; Linhas 18, 20 e 21 - cepas positivas (*A. caviae* Ti3; *A. hydrophila* Tb3; *A. hydrophila* Tb3, respectivamente; Linha 22- Mistura da reação (Controle negativo).

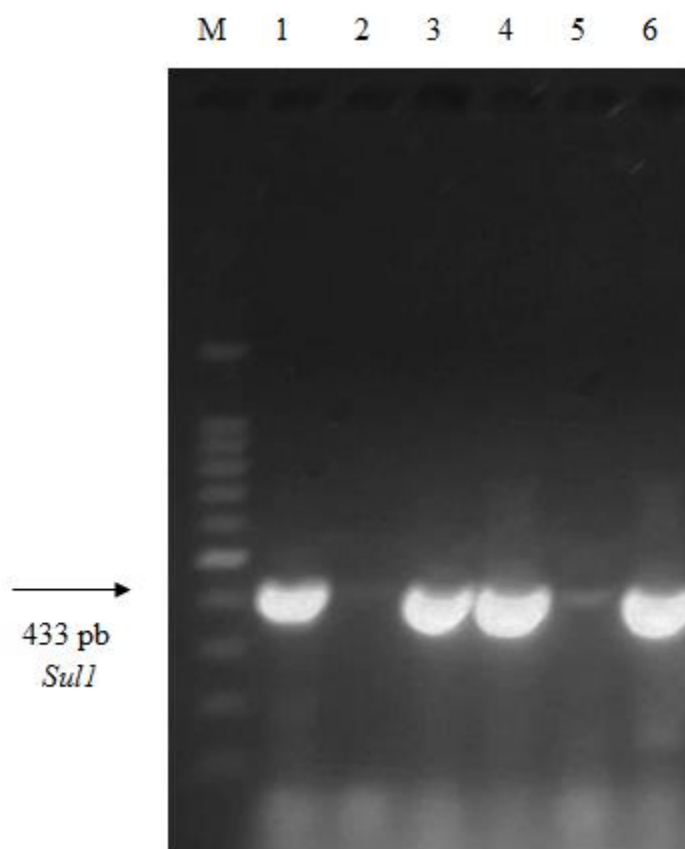
Fonte: A autora, 2016.

Para a pesquisa dos genes de resistência relacionados às demais classes de antimicrobianos, foram consideradas as cepas que apresentaram resistência, incluída a categoria intermediária, no teste de disco-difusão.

A cepa AV49 foi avaliada para os genes de resistência a quinolonas. Os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *qepA* não foram detectados.

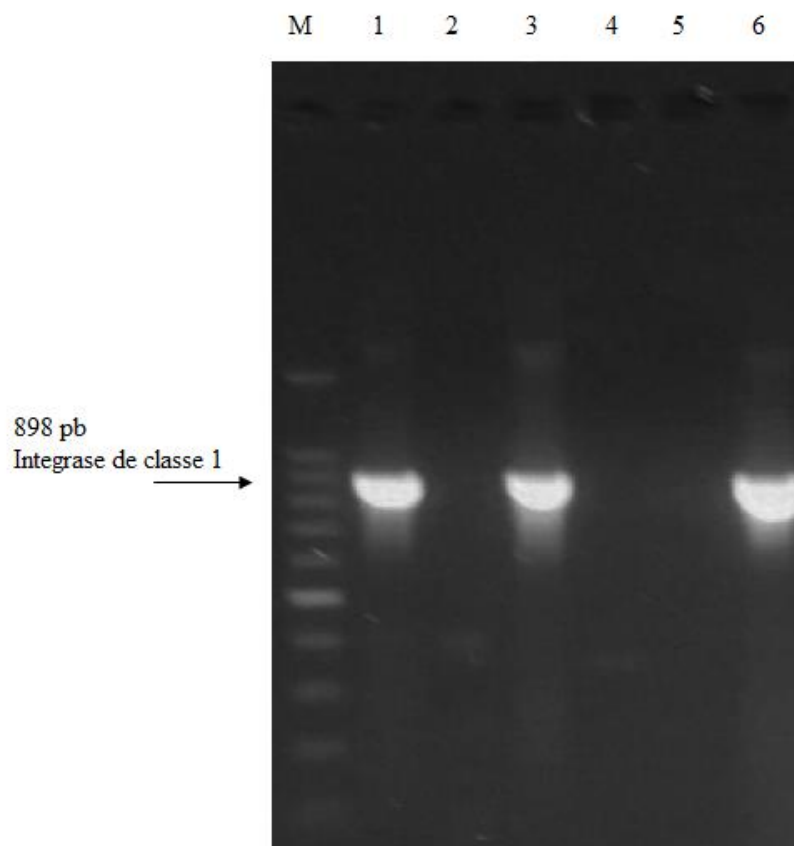
Das quatro cepas (VP4, Ac765, REB e Ac81) submetidas a PCR para a pesquisa dos genes de resistência às sulfonamidas e integrase de classe 1 (*sul1*, *sul2* e *int1*), três (VP4, Ac765 e Ac81) apresentaram o gene *sul1* e duas (Ac81 e Ac765) o gene *int1* (**Figuras 3 e 4**). Assim, as cepas Ac81 e Ac765 foram avaliadas para a presença de integron de classe 1. O resultado pode ser observado na **Figura 5**. A cepa Ac81 apresentou integron de peso molecular de aproximadamente 700 pb e a cepa Ac765, de 1000 pb (**Figura 5**).

Figura 3 — Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos da PCR para a pesquisa do gene *sull*



Legenda: M- marcador de peso molecular 100 pb, Linha 1- *E. coli* C049 (Controle positivo), Linha 2- Mistura da reação (Controle negativo), Linhas 3, 4 e 6 - cepas positivas (*A. veronii* bv *sobria* VP4; *A. caviae* Ac765; *A. caviae* Ac81, respectivamente; Linha 5- cepa negativa (*A. caviae* REB)
Fonte: A autora, 2016

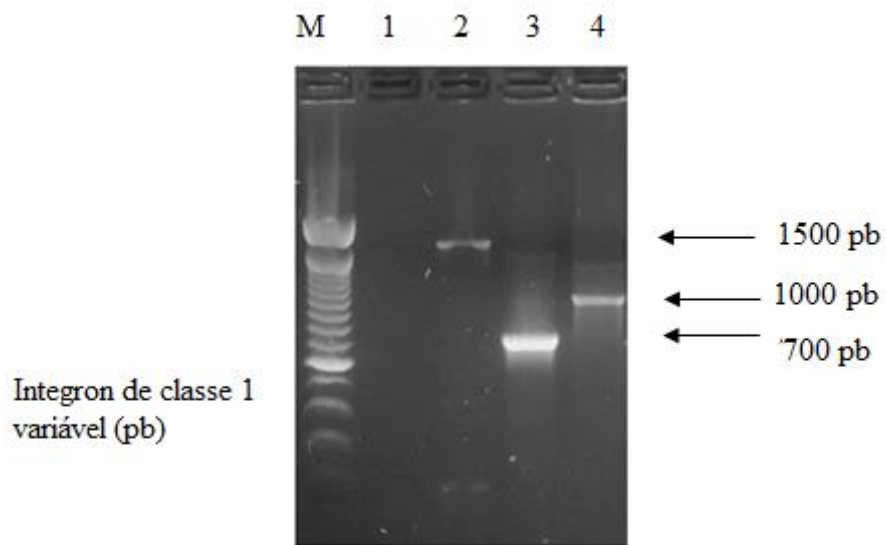
Figura 4 — Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos da PCR para a pesquisa do gene integrase de classe 1



Legenda: M-marcador de peso molecular 100 pb, Linha 1- *Salmonella* Tiphymurium S01 (Controle positivo); Linha 2- Mistura da reação (Controle negativo), Linhas 3 e 6 - cepas positivas (*A. caviae* AC81, *A. caviae* Ac 765, respectivamente); Linhas 4 e 5 - cepas negativas (*A. caviae* REB, *A. veronii* bv *sobria* VP4, respectivamente).

Fonte: A autora, 2016

Figura 5 — Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos de PCR para a pesquisa de integron classe 1

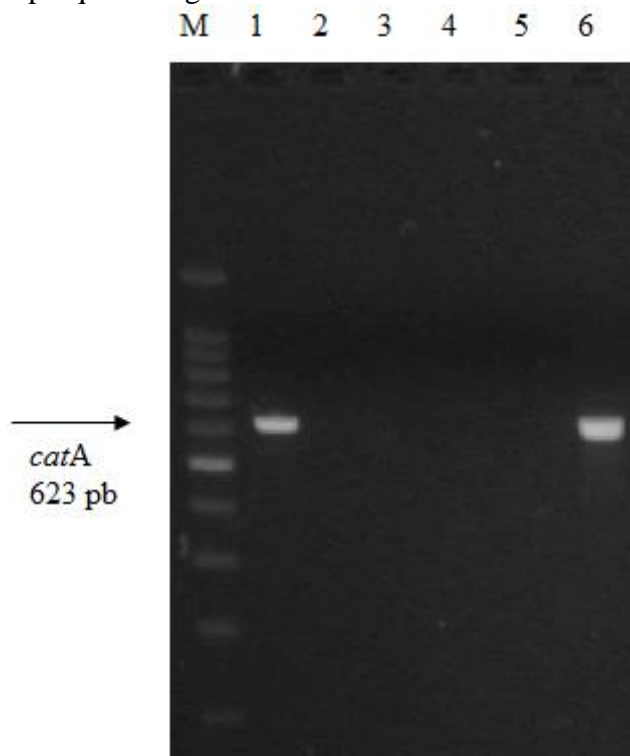


Legenda: M-marcador de peso molecular 100pb;, Linha 1- Mistura da reação (controle negativo); Linha 2- *Salmonella* Tiphymurium S01(controle positivo); Linha 3- *A. caviae* Ac81 (positiva); Linha 4- *A. caviae* Ac765 (positiva).

Fonte: A autora, 2016.

Dentre as cepas que apresentaram resistência (AV49) ou resistência intermediária (Ah10, Ac81 e Ac943) para o cloranfenicol no TDD, uma (Ac81) foi positiva para o gene *catA* e nenhuma delas apresentou os genes *cmlA* e *floR* (**Figura 6**).

Figura 6 — Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos da PCR para a pesquisa do gene *catA*

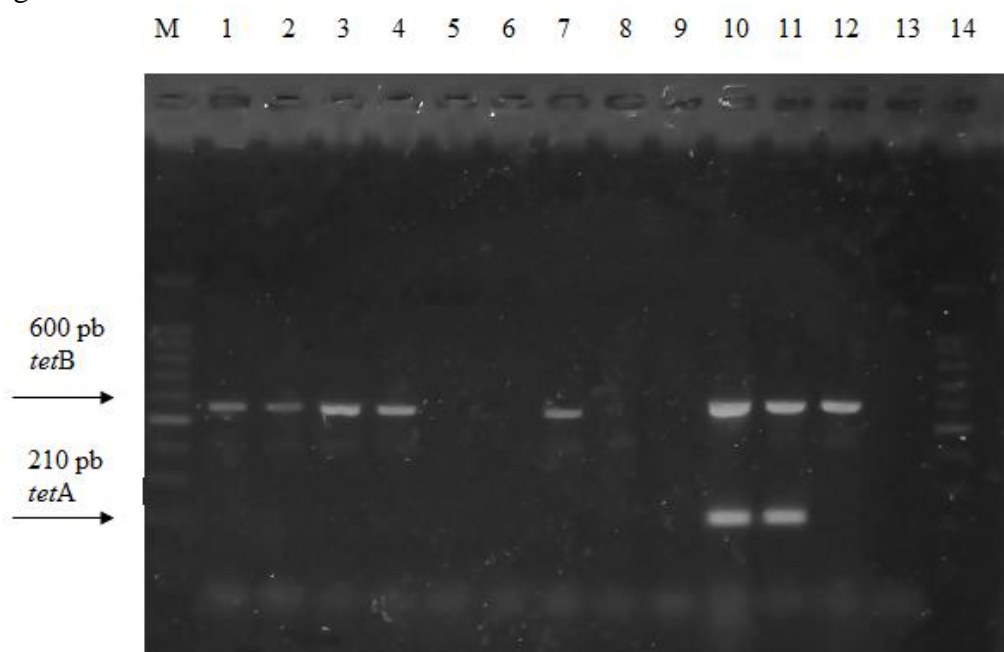


Legenda: M-marcador de peso molecular, Linha 1- *A. caviae* Ac81 (positiva), Linhas 2, 3 e 4 - cepas negativas (*A. hydrophila* Ah10, *A. caviae* AV49, *A. caviae* Ac943, respectivamente); Linha 5- Mistura da reação (controle negativo); Linha 6- *E.coli* C049 (controle positivo).

Fonte: A autora, 2016.

Como podemos observar na **Figura 7**, nove cepas (AQ38, AV60, Ac289, Ac314, Ah8, PIR3, Ac335, Ac149 e Ah650) foram avaliadas para a presença dos genes *tetA*, *tetB* e *tetG* e cinco cepas (AQ38, AV60, Ac289, Ac314 e Ac335) foram positivas para a amplificação do gene *tetB*. Estas cepas foram provenientes de queijo, vegetais e humanos (**Figura 7**). Nenhuma das cepas foi positiva para os genes *tetA* e *tetG*.

Figura 7— Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos da PCR para os genes *tetA* e *tetB*

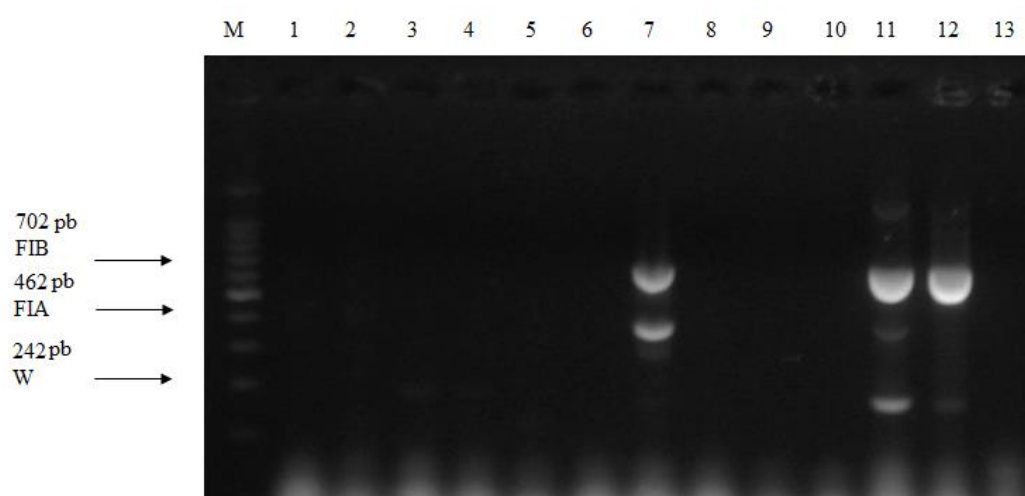


Legenda: M-marcador de peso molecular 100pb, Linhas 1, 2, 3, 4 e 7 - cepas positivas para o gene *tetB* (*A. caviae* AQ38, *A. caviae* AV60, *A. caviae* Ac289, *A. caviae* Ac314, *A. caviae* Ac335, respectivamente); Linhas 5, 6, 8 e 9 - cepas negativas *A. hydrophila* Ah8, *A. caviae* PIR3, *A. hydrophila* Ah149, *A. hydrophila* Ah650, respectivamente); Linha 10 *E.coli* 11 (controle positivo para os genes *tetA* e *tetB*), Linha 11- *E.coli* 94 (controle positivo para os genes *tetA* e *tetB*); Linha 12- *Salmonella* Tiphymurium S10 (controle positivo para *tetB*) e Linha 13- Mistura da reação (controle negativo).

Todas as cepas que foram positivas para a amplificação de algum dos genes de resistência para os β -lactâmicos (AcC16, Ti3 e Tb3), sulfonamidas (VP4, Ac765 e Ac81) clorafenicol (Ac81) e tetraciclinas (AQ38, AV60, Ac289, Ac314 e Ac335) foram avaliadas quanto à tipagem de replicons de grupos de incompatibilidade de plasmídeos (Incs) de enterobactérias: FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, e FII (CARATTOLI et al., 2005). Apenas cepas de origem clínica foram positivas para a amplificação desses marcadores. A cepa Ac314 que apresentou amplificação para

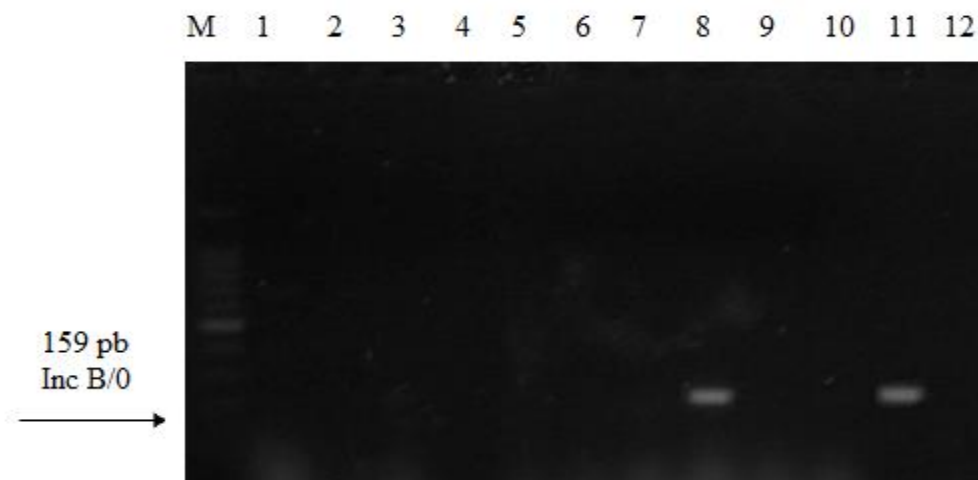
os replicons FIA e FIB (**Figura 8**) possui fenótipo de resistência para AMC, SAM, FOX, CRO e TE e foi positiva para a amplificação do gene *tetB*. O mesmo gene foi encontrado na cepa Ac 289 que apresentou amplificação positiva para o replicon B/0 e resistência aos antimicrobianos AMC, SAM, FOX, TE (**Figura 9**). Nenhuma das cepas que apresentou genes de resistência para as classes de β -lactâmicos, sulfonamidas e cloranfenicol foram positivas para a tipagem de replicons.

Figura 8 — Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos da PCR para a pesquisa dos replicons FIA, FIB e W



Legenda: M- marcador de peso molecular 100pb, Linha 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10 - cepas negativas (*A. caviae* AcC16, *A. caviae* Ac81, *A. caviae* Ac765, *A. caviae* AQ38, *A. caviae* AV60, *A. veronii* bv. *sobria* VP4, *A. caviae* Ac289, *A. hydrophila* Tb3, *A. hydrophila* Ti3, respectivamente); Linha 7 - cepa positiva (*A. caviae* Ac314); Linha 11- *E.coli* C036 (Controle positivo para FIB, FIA e W), Linha 12 – *E. coli* 11 (Controle positivo para FIB), Linha 13- Mistura da reação (controle negativo).

Figura 9 — Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% (p/v) de produtos de PCR para a pesquisa do replicon B/0



Legenda: M- marcador de peso molecular 100pb, Linhas 1, 2, 3,4,5,6,7,9 e 10 cepas negativas (*A. caviae* AcC16, *A. caviae* Ac81, *A. caviae* Ac765, *A. caviae* AQ38, *A. caviae* AV60, *A. veronii* bv. *sobria* VP4, *A. caviae* Ac314, *A. hydrophila* Tb3, *A. hydrophila* Ti3, respectivamente); Linhas 8 e 11 - cepas positivas (*A. caviae* Ac289 e *A. caviae* Ac289, respectivamente); Linha 12 - Mistura da reação (controle negativo).

Quadro 7- Perfil de resistência aos antimicrobianos, genes de resistência, presença de integrons e grupos de incompatibilidade (Incs) de plasmídeos de enterobactérias em cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de origens diversas

Cepas	Perfil de Resistência	Genes de resistência	Integrase	Integron	Tipagem de replicoms (Incs)
AcC16	AMC, SAM, CTX	<i>bla</i> _{CTX-M2}	NI	NI	-
AcTi3	SAM,CAZ	<i>bla</i> _{GES}	NI	NI	-
AhTb3	AMC,SAM,FOX e CAZ	<i>bla</i> _{GES}	NI	NI	-
AvsVP4	AMC,SAM,STX	<i>sull</i>	-	-	-
Ac765	SAM,TZP, FOX, STX	<i>sull</i>	+	+	-
Ac81	AMC,SAM,STX,C	<i>sull,catA</i>	+	+	-
AQ38	SAM,CTX, TE	<i>tetB</i>	NI	NI	-
AV60	SAM, TE	<i>tetB</i>	NI	NI	-
Ac289	AMC,SAM,FOX,TE	<i>tetB</i>	NI	NI	B/O
Ac314	AMC,SAM,FOX,CRO,TE	<i>tetB</i>	NI	NI	FIA/FIB
Ac335	TE	<i>tetB</i>	NI	NI	-

Legenda: NI=Não investigado

4 DISCUSSÃO

A ameaça à saúde pública devido ao crescimento da resistência antimicrobiana é impulsionada pelo uso adequado e inadequado de medicamentos anti-infecciosos utilizados na saúde humana, animal, produção de alimentos e, ainda, por medidas inapropriadas para controlar a disseminação de infecções (OMS, 2012). Há evidências de que os antibióticos utilizados na agricultura e no tratamento de animais para consumo humano torne seus produtos e derivados fontes de resistência antimicrobiana para a espécie humana.

Outro fator importante é a questão de saneamento e tratamento de esgoto hospitalar. Alguns antimicrobianos são usados apenas em hospitais, outros apenas prescritos para uso doméstico. Caso não haja um sistema de tratamento específico, os hospitais podem ser grandes fontes de descarga de bactérias patogênicas e de antimicrobianos no ambiente (ABREU et al., 2010). A contaminação por antimicrobianos na água contribui com a manutenção e disseminação dos genes de resistência, permitindo a perpetuação desses genes tanto em ambiente mais limpo como nos mais poluídos (HUDDLESTON; ZAK; JETER, 2006). Na natureza, estes patógenos entram em contato com outros micro-organismos potencializando seus mecanismos de resistência. Através do contato do homem com água e alimentos contaminados no ambiente, esses micro-organismos retornam ao meio hospitalar, criando um ciclo constante de disseminação de resistência.

Aeromonas são bactérias ubíquitas. Assim como este estudo, diversos outros autores têm demonstrado a presença desses micro-organismos em ambientes aquáticos, leite, vegetais, peixes e outros animais. (JANDA & ABBOTT, 2010). Como essas bactérias estão no ambiente, podem contaminar o homem através da ingestão de água e de alimentos contaminados e também através de feridas (PALÚ et al., 2006; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015). Desde os primeiros estudos publicados sobre o perfil de susceptibilidade de *Aeromonas* spp. (VON GRAEVENITZ; MENSCH, 1968; THORNSBERRY et al., 1975; FASS; BARNISHAN, 1981) já foi possível observar a resistência dessas bactérias aos β -lactâmicos penicilina, ampicilina e carbenicilina. A espécie *A. trota* é uma exceção por ser suscetível a ampicilina e a carbenicilina (CARNAHAN et al., 1991). Essa característica é atualmente reconhecida

como resistência intrínseca deste gênero e está associada à expressão cromossômica de β -lactamases e bombas de efluxo (GASTALHO et al., 2014).

Em nosso estudo, o sulbactam, inibidor de β -lactamases, combinado a ampicilina se mostrou pouco efetivo. Mais de 70 % das cepas estudadas foram resistentes a ampicilina-sulbactam. YANO et al. (2015) e YANG et al. (2016) obtiveram resultados semelhantes ao nosso trabalho. Todas as cepas estudadas por IGBINOSA & OKOH (2012) e STRATEV; DASKALOV & VASHIN (2015) foram resistentes a ampicilina-sulbactam.

Dentre as penicilinas combinadas a inibidores de β -lactamases, a piperacilina-tazobactam demonstrou ser mais eficaz (95,7% de cepas susceptíveis) do que as outras penicilinas [amoxicilina-sulbactam (69,6% de susceptibilidade) e ampicilina-sulbactam (95,7% de susceptibilidade)]. As cepas de *Aeromonas* spp. estudadas por et al. (2002) e ARAVENA-ROMÁN et al. (2012) apresentaram respectivamente 96% e 97% de susceptibilidade a piperaciclina-tazobactam, resultados compatíveis com os encontrados neste trabalho.

A resistência aos carbapenens em *Aeromonas* spp. está relacionada à presença da β -lactamases CphA, a principal MBL cromossomal encontrada nesses microorganismos. A CphA é relatada nas espécies *A. hydrophila*, *A. veronii* bv. *sobria* e *A. veronii* bv *veronii*, *A. jandaei*, *A. dhakensis* e *A. salmonicida*, mas não é descrita em cepas de *A. caviae* (ROSSOLINI et al., 1995; MARTÍN TALAVERA et al., 2006;; WU et al.; 2012). WU e colaboradores (2012) compararam diversos métodos de determinação de susceptibilidade (disco-difusão com diferentes padrões de inóculo, Etest® e diluição em ágar) para verificar qual é a metodologia mais eficaz para detectar cepas de *Aeromonas* não susceptíveis ao imipenem e correlacionar a resistência a este antimicrobiano com a presença de genes *cpha*. Eles sugeriram que o teste de disco-difusão não é eficaz na detecção de resistência ao imipenem em *Aeromonas* spp., sendo a diluição em ágar o método mais indicado para este objetivo.

Em nosso estudo apenas uma cepa (*A. caviae*) apresentou resistência a todos os carbapenens testados (meropenem, ertapenem e imipenem) e outra estirpe de *A. hydrophila* foi intermediária para o ertapenem. Considerando que utilizamos a metodologia de disco-difusão para a determinação da susceptibilidade ao imipenem, nossos resultados, quanto à presença de resistência aos carbapenens podem estar subestimados.

Devido à alta prevalência de enzimas AmpCs, codificadas cromossomicamente em *Aeromonas* spp., estar bem caracterizada na literatura, optamos por não incluir esta pesquisa em nossos estudos. Entretanto, diante dos resultados encontrados para uma cepa de origem clínica da espécie de *A. caviae* (Ac559), consideramos importante dar continuidade à investigação dos mecanismos de resistência adquirido por esta cepa. Outras MBLs já identificadas em *Aeromonas* incluem IMIS (WALSH et al., 1998), IMP-19 (NEUWIRTH et al., 2007) e VIM (LIBISCH et al., 2008).

A resistência de *Aeromonas* spp. para as cefalosporinas de 1^a, 2^a e 3^a geração é variável. Já para as cefalosporinas de 4^a geração, a maioria das cepas são susceptíveis (MCADAM, 2015). Alguns autores relataram um alto percentual de resistência a essa classe de antimicrobianos, como IGBINOSA & OKOH (2012) que demonstraram que 55,6 % das cepas de *Aeromonas* spp., isoladas de águas residuais do tratamento de plantas, foram resistentes a cefotaxima. Outros autores, como VILA et al., (2002) e NAGAR; SHASHIDHAR & BANDEKAR (2011) descreveram que todas as cepas estudadas foram susceptíveis às cefalosporinas testadas. No presente trabalho observamos resistência para cefoxitina (32,6%), cefotaxima (21,7%) e ceftazidima (19,6%). A ceftriaxona foi a cefalosporina de 3^o geração mais ativa, com mais de 90% das cepas apresentando susceptibilidade a esta droga. Para a cefepima, cefalosporina de 4^a geração, todas as estirpes de *Aeromonas* foram susceptíveis.

Alguns estudos sugerem que a resistência de *Aeromonas* spp. pode ser espécie-específica (BURGOS et al., 1990). MOTYL, MCKINLEY & JANDA (1985) evidenciaram que *A. hydrophila* apresentava maior taxa de resistência às cefalosporinas do que *A. caviae* e *A. veronii* bv. *sobria*. Obtivemos resultados compatíveis com o estudo citado, para a maioria das cefalosporinas. As cepas de *A. hydrophila* foram mais resistentes à cefoxitina, ceftazidima e ceftriaxona, enquanto as cepas de *A. caviae* apresentaram o maior percentual de resistência para a cefotaxima. É importante considerar que nos últimos anos ocorreram muitas mudanças em relação a resistência bacteriana.

O aumento da resistência às cefalosporinas de terceira geração associada à produção de β -lactamases de amplo espectro tem sido observado nos últimos anos (BHASKAR; DINOOP; MANDAL, 2015). Como não há padronização de teste de triagem para a detecção de ES β LS em *Aeromonas*, seguimos as recomendações do CLSI (2015) para a detecção de ES β LS em enterobactérias.

O teste sinérgico de duplo disco foi útil na detecção de uma cepa CTX-M positiva, mas não foi efetivo em detectar a produção de ESβLs em outras duas cepas que posteriormente foram positivas para a amplificação do gene GES, apesar de não termos controle positivo para e PCR e não ter sido possível a realização do sequenciamento. Estudos que mostraram boa relação entre o teste fenotípico e genotípico para a detecção de β-lactamases em *Aeromonas* spp. (MARAVIĆ et al.2013, WU et al. 2011) utilizaram ETEST® para o teste fenotípico confirmatório. KOKSAL et al., (2006), utilizando a mesma metodologia que o presente estudo, não encontraram cepas produtoras de ESβLs, mas como não realizaram testes de detecção genotípica, não foi possível correlacionar com nossos achados.

CHEN, KO & WU (2012) sugeriram que pode ser difícil detectar ESβLs usando cefalosporinas de terceira geração como substrato entre bactérias produtoras de AmpC. É possível que o antagonismo pelo clavulanato em produtores de ESβLs sejam mascarados pela coexistência de AmpC β-lactamases em cepas de *A. hydrophila* e *A. caviae*. Como as AmpCs não hidrolisam o cefepime, testes baseados em disco de cefepime e de cefepime combinado ao clavulanato podem representar uma alternativa para a detecção de *Aeromonas* produtoras de ESβLs. WU et al. (2011) compararam as duas técnicas mencionadas acima para a detecção de ESβLs e encontraram compatibilidade entre os testes realizados com cefalosporinas de terceira geração e os que utilizaram o cefepime como substrato. No entanto, o número limitado de cepas produtoras de ESβLs (n=4) no estudo torna incerto que o desempenho dos métodos de disco combinação a base de ceftazidima ou a base de cefotaxima seria idêntico a do teste à base de sinergia utilizando cefepima.

Encontramos discrepâncias entre a determinação da CIM e o teste de disco difusão para ceftazidima e cefotaxima. OVERMAN (1980) comparou três métodos para a determinação da susceptibilidade de cepas de *Aeromonas*: Determinação da concentração inibitória mínima, disco difusão e Autobac 1. Metade das cepas de *A. hydrophila* apresentaram divergências na determinação de susceptibilidade aos β-lactâmicos utilizando essas metodologias. LAMY et al. (2012) correlacionaram o teste de diluição em ágar com teste de disco difusão e encontraram discrepâncias para alguns antimicrobianos, mas taxas razoáveis de correlação para as cefalosporinas, cefalotina (87,7%), cefoxitina (76%), cefotaxima (99,3%) e cefepima (100%) foram encontradas.

Os relatos sobre a presença ESβLs em cepas de origem clínica e ambiental de *Aeromonas* têm aumentado em todo o mundo. Os fenótipos de ESβLs já descritos

incluem as enzimas TEM-1, TEM-24, CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-15, PER-1, PER-3, PER-6, SHV-12, VEB-1a, TLA-2 e GES-7 (MARCHANDIN et al., 2003; YE; XU; LI, 2010; GIRLICH; POIREL; NORDMANN, 2011; GÓMEZ-GARCÉS et al., 2011; PARKER; SHAW, 2011; WU et al., 2011; MARAVIĆ et al., 2013).

Em nossa investigação, a cepa AC16 (*A. caviae*), de origem clínica, apresentou amplificação positiva para o gene que codifica a enzima CTX-M2. A ampla disseminação de CTX-Ms em todo o mundo tem sido relatada como uma pandemia (CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012). O sucesso da disseminação desses genes depende da combinação de vários fatores, incluindo a captura e dispersão eficiente do gene *bla*_{CTX-M} por elementos genéticos móveis, associação desses elementos com clones bacterianos altamente bem sucedidos e alta pressão seletiva gerada pelo uso maciço de cefalosporinas de espectro ampliado (D'ANDREA et al., 2013).

No Brasil existem poucos estudos publicados sobre a presença de ESβLs em *Aeromonas*. BALSALOBRE et al. (2010) investigaram a presença dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} em cepas ambientais brasileiras de *A. hydrophila* e *A. jandaei*. Uma alta frequência do gene *bla*_{TEM-116} foi encontrada. O *bla*_{TEM-116} é uma variante intimamente relacionada com *bla*_{TEM-1}, mas não apresenta atividade ESβL.

Outras duas cepas isoladas de peixe, Ti3 (*A. caviae*) e Tb3 (*A. hydrophila*) apresentaram amplificação positiva para o gene que codifica a β-lactamase GES. ESβLs do tipo GES são relatadas principalmente em cepas clínicas de *P. aeruginosa*, mas também já foram descritas em cepas de *K. pneumoniae*. A presença de genes *bla*_{GES} presentes em integrons pode ter contribuído para a aquisição desses determinantes por bactérias Gram-negativas (POIREL et al., 2005) Posteriormente realizaremos PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) para verificar se existe alguma relação clonal entre essas cepas.

Aeromonas geralmente são sensíveis às cefalosporinas de 4ª geração, aminoglicosídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas, sulfametoxazol-trimetoprim e aztreonam (KO et al., 2003; CHUANG et al., 2011; ARAVENA-ROMÁN et al., 2012). No entanto, nos últimos anos diversos autores publicaram relatos sobre estirpes resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina, fluoroquinolonas e em menor número aos aminoglicosídeos e aztreonam (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2003; DAOOD, 2012; GAO et al., 2012 ;SKWOR et al., 2014; OSIŃSKA; HARNISZ, 2016; VAN ALPHEN et al., 2016). O aparecimento de estirpes resistentes a esses antimicrobianos também foi observado em nosso trabalho, no qual 8% das cepas

apresentaram resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim, 19,6% a tetraciclina e 2,2% às fluoroquinolonas. Não observamos resistência aos aminoglicosídeos e ao aztreonam.

YANO et al. (2015) estudando cepas isoladas de camarão encontraram resultados semelhantes aos nossos, relatando um percentual de 18% de amostras resistentes à tetraciclina. No estudo realizado por ARAVENA-ROMÁN et al. (2012) a resistência para esta classe de antimicrobianos não foi observada. Nós observamos resistência à tetraciclina em cepas de diferentes origens: clínica, ambiental e em alimentos. A tetraciclina é uma droga de amplo espectro muito utilizada na veterinária, na agricultura e na área clínica. Um dos mecanismos de resistência a esta droga é codificado por genes *tet* que podem ser mobilizados por plasmídeos, transposons e integrons (TENDENCIA; DELA PEÑA, 2002; BALASSIANO et al., 2007).

BALASSIANO et al. (2007) investigando a presença dos genes *tetA* e *tetE* demonstraram uma alta prevalência de genes *tetA* (37,5%) e *tetE* (37,5%) em cepas de *Aeromonas* spp., oriundas de espécimes clínicos e alimentos, isoladas no Brasil, assim como HAN et al. (2012) que estudando a presença dos genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* e *tetE* em 34 amostras isoladas de peixe e água verificaram que a maior frequência de genes de resistência para a tetraciclina em suas cepas era para os genes *tetE* (9/34), seguida pelo gene *tetA* (6/34) *tetD* e *tetC* (1/34.). No TSA, observamos 19,6% (n=9) de cepas resistentes à tetraciclina, entretanto, verificamos que na PCR cinco cepas apresentaram o amplicon para o gene *tetB*. Este resultado pode estar relacionado ao fato da resistência à tetraciclina poder ser codificada por vários genes *tet* e por diversos mecanismos (ROBERTS & SCHWARZ, 2009) e em nosso estudo termos utilizado iniciadores para os genes *tetA*, *tetB* e *tetG*. A presença do gene *tetB* é relatada por USUI et al. (2016) em amostras isoladas de canais urbanos. Das 30 amostras de mesma origem, o gene foi identificado em 1 delas (3,3%). A prevalência mais alta foi de genes *tetC* (20%) e *tetE* (23,3%).

Em nosso estudo 8,7% (n=4) das cepas foram resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim. Outros autores também observaram uma baixa prevalência de resistência. Assim como GHENGHESH et al.(2013) que observou a resistência a esse antimicrobiano em 4,3% de cepas isoladas de diversas origens, na Líbia. As cepas estudadas por ARAVENA-ROMÁN et al., (2012) apresentaram mais de 99% de susceptibilidade. Entretanto, IGBINOSA (2014) relatou um percentual de 36% em cepas isoladas de fezes de frango em uma fazenda agrícola da África do Sul. Frequentemente o gene de resistência para as sulfonamidas *sul1* está localizado em

integrans. Observamos que três cepas (VP4, Ac765 e Ac81), de origens clínica e ambiental, apresentaram amplificação positiva para o gene *sul1e* para a integrase classe 1. Em duas (Ac765 e Ac81), foi possível observar amplicons, de integrans classe 1, de 1000 pb e 700pb respectivamente. A presença de integrans de classe 1 pode estar relacionada a múltiplos fenótipos de resistência. Além da resistência ao STX, a cepa Ac765 também apresentou resistência aos antimicrobianos piperaciclina/tazobactam, amoxicilina/clavulanato e a cefoxitina. A cepa Ac81 foi resistente a ampicilina/sulbactam, amoxicilina/clavulanato e ao cloranfenicol e amplificou o gene de resistência ao cloranfenicol *catA*. Por apresentarem resistência a três classes de antimicrobianos, ambas foram consideradas multirresistentes.

A associação da resistência ao SXT com integrans classe 1, carreadores de cassetes gênicos, com outras propriedades de resistência traz o risco da seleção e persistência de outros genes de resistência através da pressão seletiva imposta pelo uso do SXT. Cassetes gênicos têm sido relacionados a partir de peixes, alimentos derivados da produção animal e em humanos (KADLEC et al., 2011).

NDI & BARTON (2011) publicaram um estudo sobre a incidência de determinantes de resistência em *Aeromonas* spp., isoladas de sedimento e de peixes. Em seu trabalho 31% (n= 28/90) das cepas foram positivas para *int1*, característico da presença integron de classe 1. Quinze cepas resistentes a sulfonamida amplificaram o gene *sul1* e aquelas que não apresentaram resistência ao antimicrobiano, não amplificaram o gene.

A taxa de resistência (8,7%) ao cloranfenicol observada nesse estudo é concordante com os resultados obtidos por GOÑI-URRIZA et al. (2000). Em quatro cepas resistentes ao cloranfenicol, o gene *catA* foi detectado em uma cepa de *A. caviae*, isolada de espécime clínico. DEL CASTILLO et al. (2013) e SØRUM et al. (2003) relataram a presença do gene *catA* em plasmídeos isolados de *A. hydrophila* e *A. salmonicida*, respectivamente. Um dos genes estava localizado em um transposon e o outro em um integron reiterando assim, o risco de transferência desses genes por elementos móveis.

Segundo PIOTROWSKA & POPOWSKA (2015) diversos grupos de incompatibilidade de plasmídeos de enterobactérias já foram relatados em *Aeromonas*: IncFiB, IncA/C, IncU, IncQ, IncF, IncI e *ColE-type*. Duas cepas que apresentaram resultado positivo para a amplificação do gene *tetB* apresentaram replicons para três

grupos de compatibilidade de plasmídeos: a cepa Ac314 foi positiva para os Inc FIA e FIB e a cepa Ac289 para Inc B/O.

MARAVIĆ et al. (2013) associaram um plasmídeo conjugativo do tipo FIB em *A. caviae* à presença do gene *bla_{CTX-M-15}*. SHIN et al. (2015) demonstraram que cepas de *E. coli* podem transferir genes de resistência a tetraciclinas (*tetA* e *tetB*) via replicon IncFIB. Não há relatos sobre a presença do replicon IncB/O em *Aeromonas*. Plasmídeos desse grupo de incompatibilidade são geralmente associados a genes que codificam uma β -lactamase do tipo AmpC, a CMY-2. A presença desta AmpC será investigada em nossas cepas. (VOGT et al., 2014).

Assim como em outras bactérias Gram-negativas, as cepas de *Aeromonas* podem desenvolver rapidamente fenótipos de resistência a um ou múltiplos antimicrobianos (KOKSAL et al., 2006). As cepas aqui estudadas apresentaram uma ampla variedade de perfis de resistência, um total de 27 diferentes perfis distribuídos entre as 46 cepas. A multirresistência está presente em 26,1% (n=12) das amostras. Como foi possível observar, este aumento de fenótipos de resistência em *Aeromonas* pode estar relacionado à presença de diversos genes que codificam enzimas que irão inativar/modificar o sítio ativo das drogas, bombas de efluxo, entre outros, muitas vezes associados a elementos móveis, tais como, plasmídeos, integrons e transposons, que contribuem para a disseminação da resistência aos antimicrobianos.

CONCLUSÕES

Como já era esperado, encontramos uma elevada prevalência de resistência para ampicilina-sulbactam, principalmente entre as cepas clínicas. Embora o CLSI (2006) preconize o teste de disco-difusão para este antimicrobiano, chamamos a atenção para a possível ineficácia do uso desse antimicrobiano no tratamento de infecções causadas por *Aeromonas* spp.

A resistência para os antimicrobianos tetraciclina e para as cefalosporinas de segunda e terceira geração: cefoxitina, cefotaxima e ceftazidima apresentaram percentuais em torno de 20-30%. Destacamos que as *Aeromonas* apresentam genes cromossômiais para a síntese de β -lactamases do tipo AmpC e a resistência observada para cefoxitina pode estar diretamente relacionada a este fator.

Foi possível verificar que cepas de *Aeromonas* provenientes de alimentos e do ambiente albergam marcadores genéticos para a resistência aos antimicrobianos, o que é preocupante em termos da disseminação destes determinantes em humanos e no bioma aquático.

A determinação da concentração inibitória mínima das cepas de *Aeromonas* spp. estudadas frente aos antimicrobianos cefotaxima e ceftazidima não corresponderam, em sua maioria, ao resultado encontrado no teste de disco difusão. Destacamos a importância da padronização de testes fenotípicos para detectar a produção de ES β Ls nesse gênero bacteriano, uma vez que a produção de β -lactamases do tipo AmpC podem mascarar o resultado do teste utilizado em enterobactérias.

Neste estudo foi possível demonstrar além da presença de diversos genes de resistência aos antimicrobianos nas cepas de *Aeromonas* spp. estudadas, a presença de integrons, elementos que geralmente estão associados a transposons e plasmídeos e que carregam diversos determinantes de resistência, favorecendo o aparecimento da multirresistência.

A tipagem de replicons de grupos de incompatibilidade de plasmídeos, originalmente descrito em enterobactérias, em cepas de *Aeromonas* como demonstrado em nosso estudo, comprova a transferência de elementos genéticos inter-espécies.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, S. L.; CHEUNG, W. K. W.; JANDA, J. M. The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2348–2357, 2003. ABBOTT, S. L.;
- ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. **Reviews of infectious diseases**, v. 10, n. 4, p. 677–8, 1988.
- ABREU, E. T. et al. Avaliação da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de efluente hospitalar. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 32, n. 1, 1 jan. 2010.
- ADESOJI, A. T. et al. Prevalence of tetracycline resistance genes among multi-drug resistant bacteria from selected water distribution systems in southwestern Nigeria. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, n. 1, p. 35, 25 dez. 2015.
- ADESOJI, A. T.; OGUNJOBI, A. A.; OLATOYE, I. O. Characterization of Integrons and Sulfonamide Resistance Genes among Bacteria from Drinking Water Distribution Systems in Southwestern Nigeria. **Chemotherapy**, p. 34–42, 2016.
- ADLER, A. et al. Emergence of VIM-producing *Aeromonas caviae* in Israeli hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 5, p. 1211–1214, 1 maio 2014.
- ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, D. A.; GARZA-MAYÉN, G. S.; VÁZQUEZ-LÓPEZ, R. Quinolonas: Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. **Revista chilena de infectología**, v. 32, n. 5, p. 499–504, out. 2015.
- AMBLER, R. P. The Structure of B-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 16 maio 1980.
- ANTONELLI, A. et al. Newborn bacteraemia caused by an *Aeromonas caviae* producing the VIM-1 and SHV-12 β -lactamases, encoded by a transferable plasmid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 272–274, 2016.
- ANTUNES, N.; FISHER, J. Acquired Class D β -Lactamases. **Antibiotics**, v. 3, n. 3, p. 398–434, 21 ago. 2014.
- ANTUNES, P. et al. Dissemination of Sulfonamide Resistance Genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese Salmonella enterica Strains and Relation with Integrons. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 836–839, 2005.
- ANTUNES, P.; MACHADO, J.; PEIXE, L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in Salmonella enterica isolates from different sources in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 297–304, 2006.
- ANVISA. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção de bacterias de importância médica. p. 150, 2013.
- ARAÚJO, V. S. et al. Occurrence of Staphylococcus and enteropathogens in soft cheese

- commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 6, p. 1172–1177, 2002.
- ARAVENA-ROMÁN, M. et al. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1110–1112, 2012.
- AUTO, H. J. D. F.; CONSTANT, A. B.; CONSTANT, J. M. C. **Antibióticos E Quimioterápicos**. 5. ed. Macéio: EDUFAL, 2008.
- BALASSIANO, I. T. et al. The involvement 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, nov. 2007.
- BALSALOBRE, L. C. et al. Presence of blaTEM-116 gene in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 718–719, out. 2010.
- BARROS, E.; MACHADO, A.; SPRINZ, E. **Antimicrobianos - Consulta Rápida 5ed**: 5. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2013.
- BATRA, P.; MATHUR, P.; MISRA, M. C. *Aeromonas* spp. : An Emerging Nosocomial Pathogen. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 8, n. 1, p. 1–4, 2016.
- BEUTLING, D. [Long-term cryopreservation of microbial strains relevant to food hygiene]. **Archiv für experimentelle Veterinärmedizin**, v. 43, n. 6, p. 835–41, nov. 1989.
- BHASKAR, M.; DINOOP, K. P.; MANDAL, J. Characterization of ceftriaxone-resistant *Aeromonas* spp. isolates from stool samples of both children and adults in Southern India. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 26, 1 dez. 2015.
- BROLUND, A.; SANDEGREN, L. Characterization of ESBL disseminating plasmids. **Infectious Diseases**, v. 48, n. 1, p. 18–25, 2 jan. 2016.
- BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg - 26.ed.**: 26. ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2014.
- BURGOS, A. et al. In vitro susceptibility of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* to fifteen antibacterial agents. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 413–7, jun. 1990.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 1 mar. 2010.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.
- CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M enzymes: Origin and

diffusion. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. APR, 2012.

CARATTOLI, A. et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of microbiological methods**, v. 63, n. 3, p. 219–28, 2005.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 298–304, 2013.

CARNAHAN, A. M. et al. *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. **Journal of clinical microbiology**, v. 29, n. 6, p. 1206–10, 1991.

CASTRO-ESCARPULLI, G. et al. Characterisation of *Aeromonas* spp . isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. v. 84, p. 41–49, 2003.

CATTOIR, V. et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 394–397, 2007.

CHEN, B. et al. The role of class I integrons in the dissemination of sulfonamide resistance genes in the Pearl River and Pearl River Estuary, South China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 282, p. 61–67, jan. 2015.

CHEN, P. L.; KO, W. C.; WU, C. J. Complexity of β -lactamases among clinical *Aeromonas* isolates and its clinical implications. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 45, n. 6, p. 398–403, 2012.

CHU, W.; MCLEAN, R. J. C. Quorum Signal Inhibitors and Their Potential Use against Fish Diseases. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 28, n. 2, p. 91–96, 2016.

CHUANG, H.-C. et al. Different Clinical Characteristics Among *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Aeromonas caviae* Monomicrobial Bacteremia. **Journal of Korean Medical Science**, v. 26, n. 11, p. 1415–1420, 2011.

CLSI. **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria ; Proposed Guideline**New York, 2006.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement M100 - S25**, 2015.

COLWELL, R. R. et al. Proposal to Recognize the Family Aeromonadaceae fam. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 3, p. 473–477, 1 jul. 1986.

COX, G. et al. Structural and Molecular Basis for Resistance to Aminoglycoside Antibiotics by the Adenylyltransferase ANT(2'')-Ia. **mBio**, v. 6, n. 1, p. e02180-14, 27 fev. 2015.

D'ANDREA, M. M. et al. CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 305–317, 2013.

DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection

- of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490–495, 1 mar. 2010.
- DAVIN-REGLI, A. et al. A cluster of cases of infections due to *Aeromonas hydrophila* revealed by combined RAPD and ERIC-PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 499–504, 1 jun. 1998.
- DEL CASTILLO, C. S. et al. Comparative Sequence Analysis of a Multidrug-Resistant Plasmid from *Aeromonas hydrophila*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 120–129, 1 jan. 2013.
- DENG, Y. et al. Multi-Drug Resistance Mediated by Class 1 Integrons in *Aeromonas* Isolated from Farmed Freshwater Animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 1–7, 15 jun. 2016.
- DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 3. ed. Washington: American Society of Microbiology, 2007.
- DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 160–201, 1 jan. 2010.
- EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus Listeria (2016)**. Disponível em: <www.bacterionet/Aeromonas.html>. Acesso em: 1 jun. 2016.
- EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. OXA β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 241–263, 1 abr. 2014.
- FASS, R. J.; BARNISHAN, J. **In vitro susceptibilities of *Aeromonas hydrophila* to 32 antimicrobial agents.** **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, fev. 1981.
- FAVIER, C. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490–495, 1 mar. 2010.
- FORBES, B. A. **Diagnostico Microbiologico**. 12. ed. Houston: Médica Panamericana, 2009.
- FREITAS, A. C. et al. *Aeromonas* species associated with gastroenteritis in children: prevalence, characteristics and virulence properties. **Revista de microbiologia**, v. 29, n. 2, p. 152–157, 1998.
- GAO, P. et al. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. **Water Research**, v. 46, n. 7, p. 2355–2364, 2012.
- GASTALHO, S. et al. Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p. 29–45, 2014.
- GHENGHESH, K. S. et al. *Aeromonas*-associated infections in developing countries. **Journal of infection in developing countries**, v. 2, n. 2, p. 81–98, 2008.

- GHENGHESH, K. S. et al. Antimicrobial resistance profile of *Aeromonas* species isolated from Libya. **Libyan Journal of Medicine**, v. 8, p. 21320, 24 maio 2013.
- GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Diversity of Clavulanic Acid-Inhibited Extended-Spectrum -Lactamases in *Aeromonas* spp. from the Seine River, Paris, France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1256–1261, 1 mar. 2011.
- GÓMEZ-GARCÉS, J. L. et al. Osteomyelitis associated to CTX-M-15-producing *Aeromonas hydrophila*: first description in the literature. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 70, n. 3, p. 420–2, jul. 2011.
- GOÑI-URRIZA, M. et al. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 1, p. 125–32, jan. 2000.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.
- HAN, J. E. et al. Prevalence of tet gene and complete genome sequencing of tet gene-encoded plasmid (pAHH01) isolated from *Aeromonas* species in South Korea. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 4, p. 631–638, abr. 2012.
- HOOPER, D. C.; JACOBY, G. A. Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2016.
- HUDDLESTON, J. R.; ZAK, J. C.; JETER, R. M. Antimicrobial Susceptibilities of *Aeromonas* spp. Isolated from Environmental Sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7036–7042, 1 nov. 2006.
- IGBINOSA, I. H. et al. Emerging *Aeromonas* Species Infections and Their Significance in Public Health. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–13, 2012.
- IGBINOSA, I. H. Antibigram profiling and pathogenic status of *Aeromonas* species recovered from Chicken. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 5, p. 481–485, nov. 2014.
- IGBINOSA, I. H.; OKOH, A. I. Antibiotic Susceptibility Profile of *Aeromonas* Species Isolated from Wastewater Treatment Plant. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.
- JACOBY, G. A. AmpC -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161–182, 1 jan. 2009.
- JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. **The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection** **Clinical Microbiology Reviews**, 2010.
- JARLIER, V. et al. Extended Broad-Spectrum -Lactamases Conferring Transferable Resistance to Newer -Lactam Agents in Enterobacteriaceae: Hospital Prevalence and Susceptibility Patterns. **Clinical Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 867–878, jul. 1988.

JEAN, S.-S. et al. Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: current epidemics, antimicrobial susceptibility and treatment options. **Future Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 407–425, mar. 2015.

KADLEC, K. et al. Molecular Basis of Sulfonamide and Trimethoprim Resistance in Fish-Pathogenic *Aeromonas* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 20, p. 7147–7150, 15 out. 2011.

KARAIKOS, I.; GIAMARELLOU, H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 15, n. 10, p. 1351–1370, 3 jul. 2014.

KO, W. et al. In Vitro and In Vivo Activities of Fluoroquinolones against *Aeromonas hydrophila*. v. 47, n. 7, p. 2217–2222, 2003.

KOKSAL, F. et al. Prevalence and Antimicrobial Resistance Patterns of *Aeromonas* Strains Isolated from Drinking Water Samples in Istanbul, Turkey. **Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 30–35, 22 dez. 2006.

KONG, R. Y. . et al. Identification of Oligonucleotide Primers Targeted at the 16S–23S rDNA Intergenic Spacers for Genus- and Species-specific Detection of *Aeromonads*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n. 9, p. 802–808, set. 1999.

KUPFER, M. et al. Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 56, n. 12, p. 2743–2751, 1 dez. 2006.

LAMY, B. et al. Which antibiotics and breakpoints should be used for *Aeromonas* susceptibility testing? Considerations from a comparison of agar dilution and disk diffusion methods using Enterobacteriaceae breakpoints. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 9, p. 2369–2377, 27 set. 2012.

LEESON, N.; HSUEH, P.-R. Antimicrobial resistance in the 21st century. **Future Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 297–298, mar. 2015.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia - 13ed**: 13. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

LI, J. et al. Occurrence of Chloramphenicol-Resistance Genes as Environmental Pollutants from Swine Feedlots. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 6, p. 2892–2897, 19 mar. 2013.

LIBISCH, B. et al. Identification of the First VIM Metallo- β -Lactamase-Producing Multiresistant *Aeromonas hydrophila* Strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1878–1880, 1 maio 2008a.

LIBISCH, B. et al. Identification of the first VIM metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1878–1880, 1 maio 2008b.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 2. ed.

Philadelphia: Williams & Wilkins, 1980.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock - 14ª Edição**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, mar. 2012.

MAKOWSKA, N.; KOCZURA, R.; MOKRACKA, J. Class 1 integrase, sulfonamide and tetracycline resistance genes in wastewater treatment plant and surface water. **Chemosphere**, v. 144, p. 1665–1673, fev. 2016.

MARAVIĆ, A. et al. *Aeromonas* spp. simultaneously harbouring blaCTX-M-15, blaSHV-12, blaPER-1 and blaFOX-2, in wild-growing Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from Adriatic Sea, Croatia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 2, p. 301–308, set. 2013.

MARCHANDIN, H. et al. Extended-Spectrum β -Lactamase TEM-24 in an *Aeromonas* Clinical Strain: Acquisition from the Prevalent Enterobacter aerogenes Clone in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3994–3995, 1 dez. 2003.

MARTÍN TALAVERA, B. M. et al. Susceptibilities to carbapenems and presence of cphA gene on food-borne *Aeromonas*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 677–682, jul. 2006.

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S. W. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria. In: BRENNER, D. J. et al. (Eds.). . Boston, MA: Springer US, 2005. p. 556–587.

MAZEL, D. et al. The Integron: Adaptation On Demand. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, 1 abr. 2015.

MCADAM, A. J. **Diagnostic Testing for Enteric Pathogens, An Issue of Clinics in Laboratory Medicine**. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2015.

MINARINI, L. A. R. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 474–478, 2008.

MOTYL, M. R.; MCKINLEY, G.; JANDA, J. M. In vitro susceptibilities of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* to 22 antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, n. 1, p. 151–153, 1985.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Health Sciences Brazil, 2015.

NAGAR, V.; SHASHIDHAR, R.; BANDEKAR, J. R. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Aeromonas* strains from various retail food products in Mumbai, India. **Journal of food science**, v. 76, n. 7, p. M486-92, set. 2011.

- NAMDARI, H.; CABELLI, V. J. The suicide phenomenon in motile aeromonads. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 543–547, 1989.
- NDI, O. L.; BARTON, M. D. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. **Journal of Fish Diseases**, v. 34, n. 8, p. 589–599, ago. 2011.
- NELSON, M. L.; LEVY, S. B. The history of the tetracyclines. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1241, n. 1, p. 17–32, dez. 2011.
- NEUWIRTH, C. et al. First occurrence of an IMP metallo-beta-lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4486–8, dez. 2007a.
- NEUWIRTH, C. et al. First Occurrence of an IMP Metallo- -Lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an Isolate from France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4486–4488, 1 dez. 2007b.
- NG, L.-K. et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, n. 4, p. 209–215, ago. 2001.
- OMS. A crescente ameaça da resistência antimicrobiana - Sumário. **Organização Mundial de Saúde**, p. 1–16, 2012.
- OSIŃSKA, A.; HARNISZ, M.; KORZENIEWSKA, E. Prevalence of plasmid-mediated multidrug resistance determinants in fluoroquinolone-resistant bacteria isolated from sewage and surface water. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 23, p. 10818–10831, 19 fev. 2016.
- OVERMAN, T. L. Antimicrobial Susceptibility of *Aeromonas hydrophila*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 17, n. 4, p. 612–614, 1980.
- PALÚ, A. P. et al. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. **Food Microbiology**, v. 23, n. 5, p. 504–509, ago. 2006.
- PARKER, J. L.; SHAW, J. G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**, v. 62, n. 2, p. 109–118, 2011.
- PARSHIKOV, I. A.; SUTHERLAND, J. B. Microbial transformations of antimicrobial quinolones and related drugs. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 12, p. 1731–1740, 25 dez. 2012.
- PIOTROWSKA, M.; POPOWSKA, M. **Insight into the mobilome of *Aeromonas* strains** *Frontiers in Microbiology*, 2015.
- POIREL, L. et al. Integron-Encoded GES-Type Extended-Spectrum B-Lactamase with Increased Activity toward Aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. v. 49, n. 8, p. 3593–3597, 2005.
- POULIKAKOS, P.; FALAGAS, M. E. Aminoglycoside therapy in infectious diseases. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 12, p. 1585–1597, 8 ago. 2013.

RAMIREZ, M. S. et al. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-Negatives: the *Klebsiella pneumoniae* Paradigm. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 5, p. 1–15, 3 out. 2014.

ROBERTS, M. C.; SCHWARZ, S. Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms. In: MAYERS, D. L. (Ed.). **Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. p. 183–193.

ROSSOLINI, G. M. et al. Distribution of *cphA* or related carbapenemase-encoding genes and production of carbapenemase activity in members of the genus *Aeromonas*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 2, p. 346–9, fev. 1995.

SAMARANAYAKE, L. **Fundamentos De Microbiologia E Imunologia Na Odontologia**. 4. ed. Brasil: Elsevier Health Sciences Brazil, 2012.

SCHWARZ, S. et al. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 5, p. 519–542, nov. 2004.

SHAKIL, S. et al. Aminoglycosides versus bacteria – a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. **Journal of Biomedical Science**, v. 15, n. 1, p. 5–14, 1 dez. 2007.

SHIN, S. W. et al. Prevalence of antimicrobial resistance and transfer of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolates from beef cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 16, p. 5560–5566, 2015.

SHINTANI, M.; SANCHEZ, Z. K.; KIMBARA, K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 31 mar. 2015.

SHOTTS, E. B. Diseases of Amphibians and Reptiles. In: HOFF, G. L.; FRYE, F. L.; JACOBSON, E. R. (Eds.). Boston, MA: Springer US, 1984. p. 49–57.

SILVA-SÁNCHEZ, J. et al. Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Genes in Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Pediatric Clinical Isolates in Mexico. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 17 out. 2013.

SINCLAIR, H. A. et al. Genotypic and phenotypic identification of *Aeromonas* species and CphA-mediated carbapenem resistance in Queensland, Australia. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 85, n. 1, p. 98–101, maio 2016.

SKWOR, T. et al. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* predominate among potentially pathogenic ciprofloxacin- and tetracycline-resistant *Aeromonas* isolates from Lake Erie. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 3, p. 841–8, 1 fev. 2014.

SØRUM, H. et al. Integron-Containing IncU R Plasmids pRAS1 and pAr-32 from the Fish Pathogen *Aeromonas salmonicida*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1285–1290, 13 abr. 2003.

STRATEV, D.; DASKALOV, H.; VASHIN, I. Characterisation and determination of

antimicrobial resistance of β -haemolytic *Aeromonas* spp. isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Revue Méd. Vét.**, v. 166, n. 1–2, p. 54–61, 2015.

TACÃO, M. et al. Evaluation of 16S rDNA- and gyrB -DGGE for typing members of the genus *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, n. 1, p. 11–18, maio 2005a.

TACÃO, M. et al. BOX-PCR is an Adequate Tool for Typing *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, n. 2, p. 173–179, ago. 2005b.

TACÃO, M. et al. Co-resistance to different classes of antibiotics among ESBL-producers from aquatic systems. **Water Research**, v. 48, n. 1, p. 100–107, 2014.

TENDENCIA, E. A.; DELA PEÑA, L. D. Level and percentage recovery of resistance to oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**, v. 213, n. 1–4, p. 1–13, out. 2002.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5, p. S3–S10, jun. 2006.

THONG, K. L. et al. Quinolone Resistance Mechanisms Among *Salmonella enterica* in Malaysia. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 259–272, jun. 2016.

THORNSBERRY, C. et al. Laboratory Evaluation of a Rapid Automates Susceptibility Testing System. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 7, n. 4, p. 466–480, 1975.

TOMÁS, J. M. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. **ISRN Microbiology**, v. 2012, p. 1–22, 2012.

UDUMULA, V. et al. Investigation of antibacterial mode of action for traditional and amphiphilic aminoglycosides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 6, p. 1671–1675, mar. 2013.

USUI, M. et al. Use of *Aeromonas* spp. as General Indicators of Antimicrobial Susceptibility among Bacteria in Aquatic Environments in Thailand. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. May, p. 1–7, 12 maio 2016.

VAN ALPHEN, N. A. et al. Ciprofloxacin-Resistant *Aeromonas* Infection Following Leech Therapy for Digit Replantation: Report of 2 Cases. **Journal of Hand Surgery**, v. 39, n. 3, p. 499–502, 14 set. 2016.

VAN HOEK, A. H. A. M. et al. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, 2011.

VARELA, A. R.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Quinolone resistant *Aeromonas* spp. as carriers and potential tracers of acquired antibiotic resistance in hospital and municipal wastewater. **Science of The Total Environment**, v. 542, p. 665–671, jan. 2016.

VILA, J. et al. In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. **Journal of**

Antimicrobial Chemotherapy, v. 49, n. 4, p. 701–702, 1 abr. 2002.

VILA, J. et al. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: Clinical features and antimicrobial resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 552–555, 2003.

VOGT, D. et al. Occurrence and Genetic Characteristics of Third-Generation Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* in Swiss Retail Meat. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 5, p. 485–494, out. 2014.

VON GRAEVENITZ, A.; MENSCH, A. H. The Genus *Aeromonas* in Human Bacteriology. **New England Journal of Medicine**, v. 278, n. 5, p. 245–249, fev. 1968.

WALSH, T. R. et al. Nucleotide and amino acid sequences of the metallo-beta-lactamase, ImiS, from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 436–9, fev. 1998.

WELLINGTON, E. M. et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 155–165, fev. 2013.

WU, C. J. et al. Bacteremia due to extended-spectrum- β -lactamase-producing *Aeromonas* spp. at a medical center in southern Taiwan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5813–5818, 2011.

WU, C.-J. et al. Distribution and phenotypic and genotypic detection of a metallo- β -lactamase, CphA, among bacteraemic *Aeromonas* isolates. **Journal of medical microbiology**, v. 61, n. Pt 5, p. 712–9, 1 maio 2012.

XIA, J.; GAO, J.; TANG, W. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. **BioScience Trends**, v. 10, n. 1, p. 14–21, 2016.

XIAO, Y.; HU, Y. The Major Aminoglycoside-Modifying Enzyme AAC(3)-II Found in *Escherichia coli* Determines a Significant Disparity in Its Resistance to Gentamicin and Amikacin in China. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 1, p. 42–46, fev. 2012.

YANG, Q. et al. Multidrug-Resistant *Aeromonas veronii* Recovered from Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) in China: Prevalence and Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. **Microbial Drug Resistance**, p. mdr.2015.0296, 2 ago. 2016.

YANO, Y. et al. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds. **Food Microbiology**, v. 47, p. 21–27, maio 2015.

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, n. 7, p. 843–847, 1 jul. 2010.

ZHANG, R. et al. High Prevalence of *qnr* and *aac(6^{prime})-Ib-cr* Genes in Both Water-Borne Environmental Bacteria and Clinical Isolates of *Citrobacter freundii* in China. **Microbes and Environments**, v. 27, n. 2, p. 158–163, 2012.

ZHOU, G. et al. The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents.
International Journal of Molecular Sciences, v. 16, n. 9, p. 21711–21733, 9 set. 2015.