Faculdade de Saúde Pública

Universidade de São Paulo

Análise do perfil de resistência a antibióticos e detecção
dos genes de virulência e resistência em *Aeromonas*
provenientes de amostras ambientais

Elisabeth Mendes Martins de Moura

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Saúde Pública
para obtenção do título de Mestre em
Saúde Pública.

Área de Concentração: Serviço de Saúde Pública

Orientador: Prof(a). associada Dr(a). Maria Helena Matté

São Paulo

2010

Análise do perfil de resistência a antibióticos e detecção
dos genes de virulência e resistência em *Aeromonas*
provenientes de amostras ambientais

Elisabeth Mendes Martins de Moura

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Saúde Pública
para obtenção do título de Mestre em
Saúde Pública.

Área de Concentração: Serviço de Saúde Pública

Orientador: Prof(a). associada Dr(a). Maria Helena Matté

São Paulo

2010

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

Dedico esse trabalho a meu Deus todo
Poderoso, aos meus pais Antonio Nilton
e Eliza e aos meus irmãos Eliza e
Neilton.

AGRADECIMENTOS

Para a realização desse trabalho agradeço primeiramente a Deus que me deu muita força e ânimo. Abençoou-me para que a dissertação pudesse ser realizada de forma satisfatória.

À minha orientadora Maria Helena Matté pela sua dedicação, paciência. Foi muito presente e atenciosa durante esse mestrado, ouvindo e aconselhando nas minhas dúvidas e angústias.

Às técnicas Mirian Lopes pelas conversas, conselhos, pela ajuda nas tabelas e no laboratório e Milena Dropa pela ajuda no laboratório.

Às minhas companheiras de trabalho que foram muito importantes nos momentos mais difíceis: a Helena Mayumi Muranaka e a Patricia Pereira de Souza que me ajudaram muito no começo do mestrado foram grandes amigas, sempre dispostas a me ajudar nas extrações e na separação das cepas.

A Daniele Escudeiro que logo que chegou também teve a disponibilidade de me ajudar nas diluições do DNA e nas corridas dos géis.

As aprimorandas Cristiane Macegoza Marques da Silva e Fabiana Bispo Martins que tornaram menos trabalhoso o desenvolvimento da minha prática laboratorial, ajudando na distribuição dos meios e outras atividades.

A Kelvilin Sabio Anahi que agora no final do meu trabalho estava sempre presente como amiga e conselheira. É uma pessoa que se mostrou muito interessada, inteligente.

A Camila Fonseca Rizek por ser sempre uma companheira de trabalho alegre, me fazendo rir, me ouvido, me ensinando a admirá-la pela sua força, determinação e inteligência.

A Cintia Mayer por muitas vezes me ouvir e aguentar as minhas reclamações e pelos seus conselhos. É uma pessoa muito dedicada e inteligente.

A Licia Natal Fernandez que desde da época da faculdade se mostrou uma boa amiga e me ensina muitas coisas com sua admirável paciência e dedicação. É uma pessoa alegre, disposta a ajudar e bem companheira.

Mesmo quase não trabalhando muito comigo, agradeço à Luiza Zanolli, Paola Lumazini de Moraes e Erika Paula Machado por ter ajudado no laboratório.

Aos meus pais que me apóiam sem reclamar com seus incentivos necessários para continuar. Aos meus irmãos que graças a Deus por serem pessoas maravilhosas.

A minha banca examinadora Dra. Marcia Regina Franzolin e Nilton Lincopan pelas suas correções e melhorias nesse trabalho.

Agradeço a bolsa oferecida pela CAPES.

RESUMO

Moura EMM. **Análise do perfil de resistência a antibióticos e detecção dos genes de virulência e resistência em *Aeromonas* provenientes de amostras ambientais.** [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2010

INTRODUÇÃO: As *Aeromonas* são bactérias distribuídas predominantemente em meio aquático. São consideradas patógeno emergente, podendo causar doenças em peixes como também no homem. Os problemas mais comuns são a gastroenterite no homem e morte em peixes. **OBJETIVO:** Este estudo foi desenvolvido para comparar a identificação fenotípica com a genotípica, e também para conhecer o perfil de resistência aos antibióticos em *Aeromonas caviae*, *A. aquariorum*, e *A. sanarellii* isoladas do ambiente aquático e a presença de genes de virulência e resistência. **MATERIAL E MÉTODOS:** O DNA das 24 cepas em estudo foi extraído por choque térmico e purificado utilizando CTAB. Foram realizadas as PCRs para a detecção dos genes de virulência e dos genes de resistência, após a realização do antibiograma. **RESULTADOS:** Foram identificadas 4 *A. caviae* das quais 3(75,0%) apresentaram pelo menos um dos genes *act*, *ast* ou *alt*. Das 3 *A. aquariorum*, 1(33,3%) apresentaram positividade para os genes *act* e *ast*. Entre os 5 isolados de *A. sanarellii* 1(50,0%) possuíam os genes *alt* e *ast*. Seis isolados não foram posicionados taxonomicamente entre as espécies descritas de *Aeromonas*, e dentre essas um exemplar apresentou o gene *alt*. Em relação às enzimas MBL e AmpC foram obtidos respectivamente: 3(100%) e 3(100%) em *A. aquariorum*; 2(50,0%) e 4(100%) em *A. caviae*; 3(75,0%) e 5(100%) em *Aeromonas* spp.; 1(20%) e 5(100%) *A. sanarellii*; Nenhum isolado apresentou resultado positivo, no teste fenotípico, para a produção de ESBL. Com a realização da PCR foi detectada a presença de 5 amostras com gene tipo *bla*_{MOX}, 21*bla*_{CPHA}, 17 tipo *bla*_{TEM} e 2 *cepH*. **CONCLUSÃO:** Os resultados sugerem que os isolados podem servir potencialmente como reservatórios de resistência aos antimicrobianos e ainda, que os isolados podem ser considerados patógeno emergentes e significativos para a saúde pública.

Descritores: *Aeromonas*, genes de virulência, genes de resistência, antibiograma

ABSTRACT

Moura EMM. **Analysis of antibiotic resistance profile and detection of virulence and resistance genes in *Aeromonas* from environmental samples.** [Dissertation].

São Paulo: School of Public Health College, 2010. **INTRODUCTION:** *Aeromonas* spp. is predominantly distributed in the aquatic environment. They are regarded as emerging pathogen, causing disease in fish but also in man. The most common problems are gastroenteritis in humans and death in fish. **OBJECTIVE:** This study was designed to compare phenotypic with genotypic identification, and also to know the profile of antibiotic resistance in *Aeromonas caviae*, *A. aquariorum*, and *A. sanarellii* isolated from aquatic environment and the presence of virulence genes and resistance. **MATERIAL AND METHODS:** DNA from 24 strains under study was extracted by thermal shock and purified using CTAB. PCR reactions were performed for the detection of virulence and resistance genes, after the completion of the antibiotic resistance test. **RESULTS:** We identified four *A. caviae* from which 3(75.0%) had at least one of the genes *act*, *ast* or *alt*. From 3 *A. aquariorum*, 1(33.3%) was positive for the genes *act* and *ast*. Among the five isolated *A. sanarellii*, 1(50.0%) had the *alt* and *ast* genes Six isolates were not positioned within taxonomically described species of *Aeromonas*, and among these only one strain presented the *alt* gene. Regarding the MBL and AmpC it was obtained respectively: 3(100%) and 3(100%) isolates from *A. aquariorum*; 2(50.0%) and 4(100%) isolates from *A. caviae*; 4(66.7%) and 3(50.0%) isolates from *Aeromonas* spp.; and 1(20%) and 5 (100%) isolates from *A. sanarellii*. None of the isolates showed positive results in the phenotypic test for ESBL production. The PCR reaction detected the presence of 5 strains with *bla*_{MOX}-like gene; 21 with *bla*_{C_{PHA}} gene; 17 with *bla*_{TEM}-like gene and 2 with *cepH* gene. **CONCLUSION:** These findings suggest that the isolates may serve as potential reservoirs of antimicrobial resistance and also that the isolates could be considered emerging pathogens of public health significance.

KEYWORDS: *Aeromonas*, virulence genes, resistance genes, antibiotic resistance test

INDICE

1 Introdução.....	1
1.1 Taxonomia.....	4
1.2 Virulência.....	6
1.3 Antimicrobianos.....	10
1.4 Resistência por produção de β -lactamases.....	14
1.4.1 Metallo- β -lactamases.....	18
1.4.1.1 IMP-Imipenemase.....	19
1.4.1.2 VIM-Verona Imipenemase.....	20
1.4.1.3 SPM-São Paulo metallo- β -lactamase.....	20
1.4.1.4 GIM-German Imipenemase.....	21
1.4.1.5 SIM-1-Seul Imipenemase.....	21
1.4.2 β -lactamase de Espectro Estendido.....	21
1.4.3 Cefalosporinase.....	23
1.5 Outros meios de resistência bacteriana.....	24
1.5.1 Alteração nas Porinas.....	24
1.5.2 Hiperexpressão das Bombas de Efluxo.....	25
1.5.3 Alteração nas Proteínas Ligadoras de Penicilinas (PBPs).....	25
1.6 Elementos de DNA.....	28
1.6.1 Integrons.....	28
1.7 Resistência em <i>Aeromonas</i>	30
2 Objetivos.....	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos	32
3. Material e Métodos.....	33
3.1 Extração do DNA genômico.....	33
3.2 Extração do DNA por choque térmico.....	34
3.3 Identificação molecular.....	35
3.3.1 Confirmação do gênero <i>Aeromonas</i>	35
3.3.2 Amplificação do 16S rDNA.....	35
3.3.3 Amplificação do gene <i>gyrB</i>	35
3.3.4 Visualização dos produtos de PCR.....	36
3.3.5 Identificação das Espécies.....	38
3.4 Detecção de genes de virulência.....	39
3.5 Análise fenotípica da sensibilidade aos antibióticos.....	40
3.5.1 Produção de ESBL.....	42
3.5.2 Produção de MBL.....	42
3.5.3 Produção de AmpC.....	42
3.6 Detecção de genes de resistência aos antibióticos.....	43
3.6.1 Detecção dos genes MBL: <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{cphA} e <i>bla</i> _{SPM-1}	43

3.6.2 Detecção dos genes codificadores de ESBLs: <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M}	44
3.6.3 Detecção dos genes de AmpC plasmidiais: <i>MOX-1</i> , <i>bla</i> _{LAT-1} , <i>bla</i> _{DHA-1} , <i>bla</i> _{ACC-1} , <i>bla</i> _{ACT-1} e <i>bla</i> _{FOX-1}	45
3.6.4 Detecção dos genes de AmpCs cromossômicas: <i>cepH</i>	47
3.7 Desenho de iniciadores para a pesquisa de AmpC.....	48
3.8 Purificação do amplicon e sequenciamento do fragmento <i>gyrB</i>	48
4 Resultados.....	50
4.1 Identificação.....	50
4.2 Detecção de genes de virulência.....	54
4.3 Avaliação fenotípica da sensibilidade aos antibióticos.....	56
4.4 Detecção dos genes de resistência aos antibióticos.....	60
5. Discussão.....	63
5.1 Identificação das espécies.....	64
5.2 Virulência.....	65
5.3 Resistência.....	67
5.3.1 Tetraciclina.....	68
5.3.2 Cloranfenicol.....	70
5.3.3 Fluoroquinolonas.....	71
5.3.4 Carbapenêmicos.....	72
5.3.5 Cefalosporinas	74
5.3.6 Aminoglicosídeos.....	75
5.3.7 Inibidores da via do folato.....	78
6. Conclusão.....	80
Bibliografia.....	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Números observados para as diferentes espécies de <i>Aeromonas</i> quantificadas em ambientes aquáticos.....	1
Quadro 2. Frequência relativa da ocorrência de infecções humanas associadas com <i>Aeromonas</i> mesófilas.....	3
Quadro 3 Características bioquímicas que apresentam diferenças para as espécies e de <i>Aeromonas</i> utilizadas nesse estudo.....	5
Quadro 4. Descrição dos antibióticos e de suas classes.....	13
Quadro 5 Descrição das características de β -lactamases produzidas por bactérias segundo sua classificação, substrato em que atuam e existência de inibidores.....	17
Quadro 6 Sequência dos iniciadores, e tamanho dos produtos esperados para a identificação dos organismos do gênero <i>Aeromonas</i>	38
Quadro 7 Enzimas utilizadas na identificação das espécies de <i>Aeromonas</i> de interesse para esse estudo.....	39
Quadro 8 Sequência dos iniciadores, e tamanho dos produtos esperados para genes e virulência utilizados para estudo de organismos do gênero <i>Aeromonas</i>	40
Quadro 9 Valores de halos considerados para os diferentes antibióticos utilizados no teste de disco difusão para determinação da sensibilidade antibióticos em isolados de <i>Aeromonas</i>	42

Quadro 10 Iniciadores utilizados para a pesquisa dos genes <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{CphA} , <i>bla</i> _{SPM-1} em isolados de <i>Aeromonas</i> de origem ambiental.....	45
Quadro 11 Iniciadores empregados para a pesquisa dos genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} em isolados de <i>Aeromonas</i> de origem ambiental.....	46
Quadro 12 Iniciadores empregados para a pesquisa dos genes codificadores De AmpC plasmidiais em isolados de <i>Aeromonas</i> de orgiem ambiental.....	47
Quadro 13 Iniciadores utilizados para a pesquisa do gene <i>cepH</i> em isolados de <i>Aeromonas</i> provenientes de amostras ambientais.....	48
Quadro 14 Classificação dos isolados de <i>Aeromonas</i> segundo a espécie inicial (identificação por série bioquímica), perfil de restrição do fragmento 16SrDNA e sequenciamento dos genes <i>gyrB</i>	53
Quadro 15 Gene de virulência em isolados de <i>Aeromonas</i> proveniente diferentes ambientes aquáticos.....	56
Quadro 16 Teste fenotípica de resistência a antibióticos em isolado <i>Aeromonas</i> provenientes de diferentes fontes ambientais.....	58
Quadro 17 Teste fenotípico de produção de enzimas ESBL, MBL e AmpC pelas <i>Aeromonas</i> identificadas nesse estudo.....	60
Quadro 18 Iniciadores empregados para a pesquisa dos genes AmpCs para os isolados de <i>Aeromonas</i> provenientes de amostras ambientais.....	62
Quadro 19 Pesquisa de genes de resistência a antibióticos em isolados de <i>Aeromonas</i> provenientes de amostras ambientais.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Imagem de dois géis de agarose corados com brometo de etídio (A) fragmento de 797 pb de uma região específica do gene 16S utilizando o iniciador Aero 16S. (B) banda de 1500 pb da amplificação dos genes 16S(a) e *gyrB*(b).....51

Figura 2 Árvore filogenética das espécies do gênero *Aeromonas* utilizando o gene *gyrB*. As distâncias foram computadas utilizando o método de máxima verossimilhança (TAMURA et al., 2007) utilizando o programa MEGA 4.1 Beta disponível online em [HTTP://www.megasoftware.net/mega4.1.html](http://www.megasoftware.net/mega4.1.html).....54

Figura 3 Detecção de resistência aos antibióticos em *Aeromonas*: cefotetan (CTT), foxitina (FOX), cefotaxima (CTX), cefpodoxima (CPD), ceftazidima (CAZ), imipenem (IMP), meropenem (MER); **B** - detecção fenotípica da produção de ESBL usando o método de sinergismo: cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) e cefpodoxima (CPD), em uma placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton + cloxacilina e no centro um disco de amoxicilina + ácido clavulânico; **C** – Detecção fenotípica de metalo- β -lactamase utilizando a técnica de disco combinado: imipenem (IMP), meropenem (MER) e ertapenem (ETP) e cada um desses antibióticos com o inibidor EDTA; **D** e **E** - Detecção fenotípica da produção de AmpC utilizando a técnica de discos combinados. **D** cefoxitina (FOX) e cefoxitina com ácido fenilborônico (BA), **E** (cefotetan) (CTT) e (CTT + BA).....59

1. INTRODUÇÃO

Os organismos do gênero *Aeromonas* estão distribuídos predominantemente em ambientes aquáticos, sendo encontrados na água superficial, em esgotos; na água salgada, em estuários e em água clorada. Esses microrganismos podem compor a microbiota de peixes e anfíbios e também podem ser introduzidos nos alimentos através da água contaminada (MATTE, 2004; COSTA e JUNIOR, 2007; COUTO et al., 2007; GHATAK et al., 2007; HAYES et al., 2007; KOZINSKA, 2007). Estes organismos são facilmente isolados tanto de ambientes ricos quanto pobres em nutrientes como são descritos por MARTINS (2005) no quadro 1.

Quadro 1 Números observados para as diferentes espécies de *Aeromonas* quantificadas em ambientes aquáticos.

Ambiente	Contagem típica (UFC/mL)*
Esgoto doméstico	$> 10^8$
Esgoto tratado	$10^3 - 10^5$
Água de esgoto	$10^6 - 10^8$
Rios recebendo descarga de esgoto	$10^1 - 10^4$
Rios claros, lagos e reservatórios	$10^0 - 10^2$
Água salgada	$10^2 - 10^2$
Água de consumo, pós-tratamento	$10^2 - 10^1$
Água de consumo em sistema de distribuição	$10^2 - 10^3$
Lençol freático / água de poço	$< 10^0$

Fonte: MARTINS, 2005. * UFC/mL- Unidades formadoras de colônias por mililitro.

Segundo o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005), até 2005 haviam sido descritas 16 espécies móveis de *Aeromonas* e uma espécie imóvel. Porém, são atualmente reconhecidas 24 espécies: *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii* (biovar *sobria* e *veronii*), *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*, *A. encheleia*, *A. popoffii*, *A. culicicola*, *A. aerequipenses*, e posteriormente ao Bergey's foram descritas *A. simae* (HARF-MONTEIL et al., 2004), e *A. molluscorum* (MIÑANA-GALBIS et al., 2004), *Aeromonas tecta* (DEMARTA et al., 2008) e *A. aquariorum* (MARTÍNEZ-MURCIA

et al., 2009). *A. taiwanensis* e *A. sanarellii* (ALPERI et al., 2009), *A. piscicola* (BEAZ-HIDALGO et al., 2009) e mais recentemente as *A. fluvialis* (ALPERI et al., 2010), *A. rivuli* (FIGUERAS et al., 2010) e a *A. diversa* que anteriormente era denominada como *Aeromonas* 501 por MIÑANA-GALBIS et al. (2010).

A taxonomia complexa do gênero *Aeromonas* sugere que os dados relativos à presença destes organismos em amostras ambientais e clínicas podem estar subestimados e que a epidemiologia desses organismos deve ser elucidada (MATTÉ, 2004).

As espécies móveis do gênero das *Aeromonas* estão relacionadas com diversos tipos de doença no homem, a qual pode se apresentar como uma diarreia auto-limitada ou ainda tão severa como a diarreia colérica (MATTÉ, 2004; MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005). Também podem ser citadas, em menor proporção, infecções extra-intestinais como a de mucosas, casos de necrose e mesmo septicemia (PEREIRA et al., 2004; CABRERA et al., 2007; SIERRA et al., 2007).

No caso da diarreia semelhante à colérica ocorre a elevação dos níveis de AMPcíclico e de proteoglicana no epitélio intestinal. (MERINO et al., 1995).

Organismos do gênero *Aeromonas* podem também causar doenças clínicas relevantes como: endocardites, septicemias, bacteremias, meningoencefalites, pneumonias, peritonites e infecções hepatobiliares, celulites, artrites purulentas, úlceras córneas, meningites e infecções oculares, nas quais os patógenos principais descritos foram organismos do gênero *Aeromonas* (AGARWAL et al., 2007; CABRERA et al., 2007; HAYES et al., 2007; KOZINSKA, 2007; PEREIRA et al., 2004). Os casos mais severos ocorreram em indivíduos com fatores predisponentes; no entanto, em indivíduos saudáveis, na maioria dos casos, a evolução da doença é auto-limitada (PEREIRA et al., 2004).

MARTINS, 2005 descreveu em um estudo realizado em 2005 a frequência com que as doenças causadas por microrganismos do gênero *Aeromonas* foi observada em humanos. Os tipos de infecções e características estão descritos no quadro 2.

Das 24 espécies de *Aeromonas* descritas, *Aeromonas schubertii* juntamente com *A. veronii* bv *veronii* e *A. jandaei* são as espécies com menor número de relato em casos clínicos. Já *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii* bv *sobria* e *Aeromonas*

hydrophila foram relacionadas mais freqüentemente com doenças no homem (GALBIS et al., 2004 e GHATAK et al., 2007). Em 85% dos casos clínicos em que as *Aeromonas* foram consideradas como principal agente, as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar *sobria* foram identificadas com maior freqüência (CHIM et al., 2007; WEI et al., 2008).

Quadro 2. Freqüência relativa da ocorrência de infecções humanas associadas com *Aeromonas* mesófilas.

Tipo de infecção	Características	Freqüência relativa ^a
Diarréia secretora	Diarréia aguda aquosa, vômito	Muito comum
Diarréia disenteria	Diarréia aguda com sangue mucoso.	Comum
Diarréia crônica colérica	Diarréia com mais de dez dias de duração, fezes tipo “água de arroz”	Incomum
Celulites sistêmicas	Inflamação do tecido conectivo	Comum
Mionecroses	Hemorragia, necroses com/sem gás	Raro
Eritema gangrenoso	Lesões na pele com pontos necróticos, sépsis	Incomum
Septicemia	Febre, calafrios, Hipotensão, alta mortalidade	Comum
Peritonites	Inflamação do peritônio	Incomum
Pneumonia	Pneumonia com septicemia, algumas vezes necroses	Raro
Osteomielites	Inflamação do osso seguida de uma Infecção do tecido mole	Raro
Colecistites	Infecção aguda da vesícula biliar	Raro
Infecções oculares	Conjuntivites, ulcera corneal e endoftalmite	Raro

Fonte: MARTINS, 2005; ^a Freqüência relativa de todos os casos de infecção por *Aeromonas*.

Recentemente um estudo realizado por FIGUERAS et al. (2009) demonstrou a presença de *A. aquariorum*, uma espécie de *Aeromonas* que havia sido isolada inicialmente de peixes ornamentais, em amostras clínicas de fezes e sangue de humanos internados em um hospital em Taiwan. Os isolados apresentavam uma variedade de fatores de virulência, de genes de resistência a diferentes classes de

antibióticos e compunham um mesmo clone microbiológico. Os autores salientaram a necessidade de considerar esse gênero de bactérias nos casos clínicos intestinais e extraintestinais.

1.1. TAXONOMIA

Bactérias do gênero *Aeromonas* pertencem à família *Aeromonadaceae* que se apresentam na forma de bacilos Gram-negativos, são organismos anaeróbios facultativos, oxidase e catalase positivas (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

São organismos fermentadores da glicose e de outros carboidratos com produção de gás, têm a capacidade de reduzir o nitrato em nitrito (quadro 3). A temperatura ótima para o seu crescimento varia entre 22°C e 37°C (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

O gênero *Aeromonas* está dividido em duas categorias: formas imóveis, *Aeromonas salmonicida* e suas subespécies; e as formas móveis a qual comporta todas as outras espécies descritas de *Aeromonas* (KOZIŃSKA, 2007). As *Aeromonas* imóveis são conhecidas como patógenos de peixes e não existem relatos desses organismos associados a infecções em humanos. Já as *Aeromonas* móveis representam um grupo de bactérias aquáticas, que são patógenos emergentes, causadoras de doenças em humanos e animais (MATTÉ, 2004; MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005; AGERSO et al., 2007).

Há controvérsias na definição da taxonomia do gênero *Aeromonas* que reside na complexa identificação das espécies quando se utilizam os métodos fenotípicos; devido à existência de grande divergência no reconhecimento dos grupos de hibridização (HGs) (NHUNG et al., 2007). Desta forma é crucial a utilização de métodos moleculares para identificação do posicionamento taxonômico das espécies de *Aeromonas*. Para tanto vários genes foram utilizados para o estudo taxonômico deste grupo de bactérias, como 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* e gene *cpn60* (MATTÉ et al., 2007; NHUNG et al., 2007; MIÑANA-GALBIS et al., 2009).

Quadro 3 Características bioquímicas que apresentam diferenças para as espécies de *Aeromonas* utilizadas nesse estudo.

Características	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sanarelli i</i>	<i>A. jandaei</i>
Produção de pigmentação marrom	-	-	-	-	-
D-glicose	-	+	+	+	+
H ₂ S	-	+	+	-	+
Indol	+	+	+	-	+
Descarboxilação da ornitina	-	-	-	+	-
Teste de Voges-proskauer	-	+	+	-	+
L-arabinose	+	-	d	+	-
D-manitol	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	+	-
Sacarose	+	+	+	+	d
Celobiose	+	-	-	+	-
Salicina	+	+	+	+	-
Hidrolise da esculina	+	+	+	+	-
Hidrolise da arbutina	+	+	+	+	-

Fonte: MARTÍNEZ-MURCIA et al., 2008 e ALPERI et al., 2009; +, 85–100% de linhagem positivas; d, 16–84% de linhagem positivas; -, 0–15% de linhagem positivas.

Os métodos moleculares demonstraram-se bem mais exatos comparados com os métodos fenotípicos (CHACON et al., 2003), podendo ser utilizados em estudos epidemiológicos, geográficos, bem como de diversidade genética das várias linhagens de microrganismos patogênicos ou não patogênicos (AGUILERA-ARREOLA et al., 2007).

Uma vez que os métodos moleculares oferecem resultados mais rápidos de serem interpretados, estes podem ser usados para análises das espécies do gênero *Aeromonas* que têm importância clínica e epidemiológica, devido à capacidade de invasão, síntese de toxinas e ao perfil de suscetibilidade aos antibióticos desses microrganismos (GHATAK et al., 2007; CABRERA et al., 2007).

1.2. VIRULÊNCIA

A virulência das bactérias é freqüentemente iniciada por fatores que induzem mudanças bioquímicas no tecido do hospedeiro; esta interação entre a bactéria e o hospedeiro resulta na doença (COUTO et al., 2007).

Os fatores de virulência podem ser divididos em duas categorias: **propriedades celulares** que são aderência, mobilidade e capacidade de invadir as células e **propriedade extracelular**, que consiste na secreção de substâncias que possuem atividades hemolíticas, proteolíticas, endotóxicas, enterotóxicas, citotóxicas, as quais são capazes de provocar várias alterações bioquímicas e, conseqüentemente, distúrbios no hospedeiro (EPPLE et al., 2004, IMAMURA et al., 2006; NAWAZ et al., 2006; COSTA e JUNIOR, 2007; COUTO et al., 2007).

Considerando a propriedade extracelular de virulência, algumas linhagens de *Aeromonas* podem produzir dois tipos de toxinas: a citopática e a citotóxica. A toxina citopática não causa a destruição das criptas e microvilos intestinais, no entanto, provoca a secreção de água e sal pelas células intestinais, enquanto a citotóxica resulta na destruição das células do intestino do hospedeiro, sendo assim mais agressiva que a anterior (COUTO et al., 2007).

A virulência do gênero *Aeromonas* pode ser muitas vezes devido à produção de substâncias como aerolisinas, fosfolipases e hemolisinas, que podem provocar diarreia (MERINO et al., 1995). Neste caso, o mecanismo de infecção não está totalmente elucidado, porém pode ser devido à ação de íons secretados ou ainda pela injúria na parede do epitélio do intestino do hospedeiro. Acredita-se que tanto a secreção de íons como a injúria na parede do epitélio sejam causadas pela β -hemolisina (EPPLE et al., 2004).

Estudos identificaram seis genes que estão relacionados com a virulência das *Aeromonas*: os genes das elastases, das lipases, do flagelo polar e os três genes de enterotoxinas: a enterotoxina citotônica termolábil (*alt*), a enterotoxina citotóxica termoestável (*ast*) e a citotoxina (*act*) (AGUILERA-ARREOLA et al., 2007). A enterotoxina citotóxica (gene *act*), também conhecida como enterotoxina citolítica é composta por um único polipeptídio de 52KDa. Esta enterotoxina é secretada,

primeiramente, inativa, sendo posteriormente ativada; e na forma ativa é capaz de produzir poros na parede dos eritrócitos (RAHIM et al., 2006).

Os genes *act*, que codificam a produção das hemolisinas são também denominados *hlyA* e *aerA* e foram observados em *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* bv *sobria* e *A. jandaei*. Essa toxina causa hemólise nas células o que contribui para o aparecimento de sintomas no hospedeiro (HEUZENROEDER et al., 1999; BALSALOBRE et al., 2009b).

A hemolisina é sintetizada como um componente precursor, e formada por três regiões: a região pré-matura, madura, pro-madura, sendo que sobre essa pro-hemolisina não se conhece ou não foi encontrada qualquer atividade até que seja quebrada por uma protease que remova a região carboxila terminal e assim se torne uma hemolisina ativa (NOMURA et al., 2000).

Existem dois tipos de hemolisina: α -hemolisina e β -hemolisina. A α -hemolisina é produzida durante a fase estacionária do crescimento bacteriano, causando um efeito citotóxico reversível e provocando a lise incompleta dos eritrócitos. Já a β -hemolisina é produzida na fase de crescimento bacteriano, causando a lise completa e conseqüentemente a destruição completa dos eritrócitos (THELESTAM e LJUNGH, 1981; KIROV et al., 1993).

Portanto, a função principal da β -hemolisina, é produzir acúmulo de fluido no intestino do hospedeiro provocando a ativação dos mediadores inflamatórios dos granulócitos favorecendo, deste modo, a indução do apoptose das células hospedeiras (EPPLÉ et al., 2004).

Na virulência do gênero *Aeromonas* estão envolvidos dois sistemas de secreção de proteínas: o sistema de secreção tipo II (T2SS) e o tipo III (T3SS). Esses sistemas são responsáveis pelo transporte de proteína bacteriana denominada de efetora, sendo responsáveis pelo sistema que transporta proteína através de uma membrana biológica (SIERRA et al., 2007, KHAJANCHI et al., 2009).

Foram descritas quatro proteínas do tipo III: AexT, AopP, AopH e AopO, (SIERRA et al., 2007), todas elas codificadas geneticamente em plasmídio com exceção da AexT. Portanto a presença de plasmídios, portadores de genes de resistência ou virulência inspira grande preocupação uma vez que estes elementos extra cromossômicos, podem transferir genes para diferentes bactérias (SAAVEDRA

et al., 2007). Em um estudo desenvolvido por KHAJANCHI et al. (2009), a proteína AexU foi encontrada associada com a ADP-ribosilação das células do hospedeiro, com a inibição da fagocitose e a indução da apoptose e consequentemente a morte em ratos.

Além das hemolisinas existem ainda outras exotoxinas como as nucleases, amilases e diferentes tipos de lipases (MERINO et al., 1995).

Outra substância importante para a área clínica é a serina protease (ASP), exotoxina liberada por algumas espécies de *Aeromonas*, e que pode estar envolvida, no choque séptico. Esta substância é capaz de provocar a coagulação do plasma e a queda da pressão sanguínea do hospedeiro devido ao vazamento do líquido intravascular (NITTA et al., 2007).

Essa protease ajuda na invasão do microrganismo, quebrando as barreiras do hospedeiro. Foram identificados três tipos de proteases em espécies de *Aeromonas*: uma serina protease termolábil e duas metaloproteases uma sensível e a outra insensíveis ao EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (PEMBERTON et al., 1997).

Além das substâncias secretadas, muitos isolados do gênero *Aeromonas* possuem estruturas como lipopolisacarídeos da membrana externa (LPS), camada externa da parede celular (S-Layer), pili e flagelo, além de produzirem biofilme, sendo conhecidos por serem importantes fatores de virulência (AGUILERA-ARREOLA, 2007).

O LPS, lipopolisacarídeo da membrana externa da parede bacteriana, é uma estrutura que contém propriedade de endotoxinas e é responsável pela aderência e pela resposta imunológica do hospedeiro. Essa estrutura é descrita como um fator de virulência, e é considerado o maior componente da parede celular das bactérias Gram-negativas (AGARWAL et al., 2007).

No gênero *Aeromonas* o LPS é responsável pela colonização do intestino do hospedeiro o que o torna importante na patogenicidade desse organismo; foram descritos uma grande variedade de proteínas de membrana externa e de lipossacarídeos em *Aeromonas hydrophila* isoladas de peixes (SUBASHKUMAR et al., 2007).

O LPS é formado por um lipídio do tipo A (altamente conservado), por um oligossacarídeo e por um antígeno O específico. O antígeno O é uma proteína que compõe a parte mais externa da parede celular bacteriana com função de aderência e colonização. Os sorotipos O:11 e O:34 são as linhagens mais comuns dentro das espécies de *Aeromonas* causadoras de doenças (MERINO et al., 1995 e JIMENEZ et al., 2008).

A camada externa da parede celular (S-Layer) é uma matriz protéica ou glicoproteínas ligadas à parede celular bacteriana formando um envoltório externo à parede celular bacteriana. Esse envoltório é muito comum no gênero *Aeromonas* e possibilita à célula bacteriana aderir a outras células ou superfícies e a proteger de ações do hospedeiro como fagocitose e apoptose (MERINO et al., 1995).

A cápsula é uma estrutura monossacarídica e glicosídica que recobre a membrana externa das bactérias (ROBERTS, 1996). As bactérias do gênero *Aeromonas* que crescem em meio rico em glicose formam uma cápsula espessa com a finalidade de aumentar a sua capacidade de aderência em diferentes superfícies evitando a apoptose e a fagocitose. Acredita-se que essa estrutura incrementa a patogenicidade das linhagens que a possuem como, por exemplo, *A. veronii* bv *sobria* e *A. hydrophila* (MERINO et al., 1995).

Algumas espécies de *Aeromonas* tem a capacidade de produzir biofilme que serve como proteção às pressões do meio em que vivem favorecendo sua sobrevivência em vários nichos ecológicos. Esta proteção permite que as bactérias deste gênero se adaptem fisiologicamente aos diferentes ambientes de onde foram isoladas como solo, água, animais (LI et al., 2006; AGARWAL et al., 2007; RAHMAN et al., 2007).

Outra função do biofilme é favorecer a adesão da bactéria à célula do hospedeiro para que o microrganismo possa invadi-la (RAHMAN et al., 2007). No entanto, como o biofilme proporciona a capacidade de aderir a qualquer superfície, essa estrutura pode ser encontrada nas canalizações de águas, biorreatores, submarinos, periscópios, dentes, intestinos, rúmen, biomateriais médicos (LARAMÉE et al., 2000).

A formação do biofilme é uma ligação irreversível a uma superfície. Ao se ligar a esta superfície o organismo começa a produzir polímeros extracelulares que

facilitam essa união e conseqüentemente provocam mudanças no índice de crescimento e de transcrição nos indivíduos destas colônias (DONLAN, 2001).

O biofilme é importante na área médica, pois muda drasticamente a suscetibilidade da bactéria aos antibióticos e, muitas vezes, impede que o fármaco chegue aos organismos localizados no interior dessa estrutura, dificultando a eliminação de algumas contaminações em aparelhos, como cateteres e próteses (DONLAN, 2001).

Organismos do gênero *Aeromonas* podem ainda apresentar estrutura como flagelo e pili que são estruturas de origem protéica, e estão relacionadas com a aderência e colonização nas células hospedeiras (KIROV et al., 2000; AGUILERA-ARREOLA et al., 2007).

1.3 ANTIMICROBIANOS

Para o tratamento de algumas infecções de origem bacteriana são empregados antibióticos de amplo espectro, como os β -lactâmicos (NAWAZ et al., 2006), que podem agir de quatro modos diferentes.

- Na biossíntese celular, como as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos e os glicopeptídeos;
- Interferem com a biossíntese protéica, como as tetraciclinas, macrolídeos e aminoglicosídeos;
- Agem na síntese dos ácidos nucleicos (fluoroquinolonas e rifampicina)
- Ou podem interferir nas vias metabólicas da bactéria (trimetoprimas e sulfametoxazol).

Os antimicrobianos podem ser classificados pela sua estrutura química; pelo tipos de microrganismos em que agem; ou pelo efeito que causam nesses microrganismos (TAVARES, 2001). (quadro 4).

A classificação dos antimicrobianos com base na estrutura química é importante na área clínica pois substância do mesmo grupo apresentam mecanismos de ação semelhantes e partilham, parcial ou totalmente, os organismos sobre os quais atuam (TAVARES, 2001).

A classificação é feita segundo o efeito causado sobre os microrganismos. Os agentes **bactericidas** provocam a síntese de uma parede defeituosa ou podem provocar a ausência da formação dos septos que são importantes na fase de divisão celular bacteriana. Agentes **bacteriostáticos** inibem o crescimento e a reprodução bacteriana sem provocar sua morte imediata, esse efeito é reversível uma vez retirada a droga (TAVARES, 2001).

As bactérias desenvolvem mecanismos para se defender dos antimicrobianos, que são as formas de resistência. A forma de resistência pode ser natural, ou intrínseca, essa resistência caracteriza a espécie bacteriana e compõe a herança genética cromossômica deste microrganismo (TAVARES, 2001).

A resistência natural é um caráter hereditário, transmitida verticalmente às células filhas codificada por genes cromossômicos, os quais determinam na célula bacteriana a ausência de receptores para a ação dos antibióticos ou a existência de estruturas e mecanismos que impedem a ação da droga (TAVARES, 2001).

Resistência adquirida consiste no surgimento do fenômeno da resistência a um ou vários antimicrobianos numa população bacteriana originalmente sensível. Trata-se, portanto, de uma propriedade nova que surge em exemplares de uma espécie bacteriana os quais em um determinado momento passam a não mais sofrer a ação de drogas que são efetivas contra o restante da população (TAVARES, 2001).

A resistência adquirida resulta de modificações na estrutura ou no funcionamento da célula bacteriana, as quais são decorrentes de fatores genéticos adquiridos por mecanismos que alteram o cromossomo bacteriano ou por elementos extra-cromossômicos (TAVARES, 2001).

A resistência induzida ocorre quando se ministra um antibiótico e inicialmente o microrganismo se mostra sensível a este, mas passando o tempo o paciente tem uma decaída, significando a multiplicação da bactéria, ou seja, a diminuição do efeito do antibiótico (TAVARES, 2001).

Este fenômeno começou a ser mais notado com a introdução das cefalosporinas da segunda geração, especialmente com o uso clínico do cefamandol e da cefoxitina após a observação de insucesso na terapêutica de infecções por bacilos Gram-negativos com estas drogas, devido à emergência da resistência durante o tratamento (TAVARES, 2001).

Com o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos utilizados foi desenvolvido o estudo da sensibilidade dos microrganismos à ação dos antimicrobianos que pode ser determinada *in vitro*, por meio do antibiograma, permitindo uma terapia bem orientada e segura para o hospedeiro (TAVARES, 2001). Foram desenvolvidos dois métodos para a realização do antibiograma um deles é a concentração inibitória mínima (CIM, CBM) e o outro é o teste de disco difusão.

Os métodos de avaliação da sensibilidade de bactérias aos antibióticos consistem em determinar a menor concentração capaz de inibir o crescimento da bactéria - concentração inibitória mínima (C.I.M ou M.I.C). Esse conceito é utilizado para antibióticos bacteriostáticos. A concentração bactericida mínima do medicamento (C.B.M ou M.B.C) é empregada para agentes bactericidas. Nos dois casos são utilizados métodos quantitativos, para determinação da quantidade exata necessária para impedir o crescimento bacteriano (TAVARES, 2001).

O teste de disco difusão é um método qualitativo de determinação da sensibilidade bacteriana aos antibióticos, sendo o mais utilizado na rotina laboratorial por ser de fácil e rápida obtenção dos resultados. A leitura se faz pelo diâmetro do halo de inibição em milímetro, padronizado de acordo com a droga, concentração utilizada e microrganismo em estudo. Em geral, o resultado é expresso em sensível, intermediária e resistente (TAVARES, 2001).

Quadro 4. Descrição dos antibióticos e de suas classes.

Classes	Antibióticos	Função
Penicilinas	Ampicilinas	Inibem a síntese da parede celular das bactérias. Essa interferência leva à formação de uma parede celular defeituosa, com instabilidade de permeabilidade provocando a morte da bactéria por lise. Também pode interferir na ativação do sistema autolítico endógeno da bactéria. São bactericidas
Carbapenêmicos	Imipenem, Meropenem, Ertapenem	
Cefens	Cefalotina (1º geração); cefoxitina (2º geração); cefotaxima, Cefodizima, cefpodoxima e ceftazidima (3º geração); cefepime (4º geração)	
Monobactâmicos	Aztreonam	
fluoroquinolonas	Acido nalidíxico	Possuem ação bactericida ao interferir na síntese de DNA bacteriano, inibindo a DNA-girase enzima bacteriana responsável pela replicação
Quinolonas	Ciprofloxacina	
Aminoglicosídeos	Gentamicinas e Estreptomicinas	Penetram a parede celular e a membrana, ligando-se a subunidade ribossômica 30S, provocando erro na leitura de RNA mensageiro provocando a morte de bactérias. Provoca um efeito bactericida, atuam normalmente sobre os bacilos Gram-negativos
Sulfonamidas – inibidores da via do folato	Sulfametoxazol + Trimetropin	Sulfonamida é antagonista competitivo do PABA, impedindo a utilização de ácido fólico pela bactéria. A Trimetropina possui efeito sinérgico com sulfonamida, os dois antibióticos juntos impedem a síntese de tetraidrofolato através da inibição da diidrofolato-redutase
Fenicois	Cloranfenicol	Lipossolúvel difunde-se através da membrana celular bacteriana e se une de forma reversível à subunidade 50S dos ribossomos bacterianos, onde evita a transferência de aminoácidos às cadeias peptídicas em formação.
Tetraciclinas	Tetraciclinas	Bacteriostático de amplo espectro que atuam por inibição da síntese de proteínas. A união reversível se produz na subunidade ribossômica 30S dos microrganismos sensíveis. Não inibem a síntese da parede celular bacteriana. As tetraciclinas tem o mesmo mecanismo de ação sobre todos os microrganismos.
Lincosamidas	Clindamicinas	Inibi a biossíntese da parede celular, afeta a permeabilidade da membrana celular bacteriana e inibe a síntese de RNA.

Fonte: TAVARES, 2001

1.4 RESISTÊNCIA POR PRODUÇÃO DE β -LACTAMASES

As bactérias podem tornar-se resistentes aos antibióticos através de três mecanismos principais: alteração do sítio de ação (PBPs); redução da permeabilidade da membrana externa bacteriana; e produção de enzimas (NOGUEIRA, 2005).

Os antibióticos β -lactâmicos podem ser o substrato para três diferentes tipos de enzimas produzidas por bactérias; amidases (ou acilases), esterases e β -lactamases, das quais a última representa o mais importante mecanismo de resistência bacteriana (TAVARES, 2001).

As amidases (ou acilases) quebram a ligação amida na posição 6-amino do núcleo das penicilinas e na posição 7-amino do núcleo das cefalosporinas. As amidases não parecem ter importância na resistência microbiana, pois sua ação é reversível e varia de acordo com condições de pH e temperatura bem como com a concentração do substrato. Estas enzimas, entretanto, são utilizadas pela indústria de antibióticos na produção de derivados semi-sintéticos (TAVARES, 2001).

As esterases são encontradas tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas e são capazes de desacetilar as cefalosporinas que possuem um radical acetoximetila na posição C-3. Tais cefalosporinas incluem a cefalotina, cefacetrila, cefapirina, cefaloglicina e cefotaxima, além das próprias cefalosporina C, usada para a síntese das várias cefalosporinas semi-sintéticas (TAVARES, 2001).

O aparecimento de formas bacterianas resistentes as drogas de uso comum tem grande importância na saúde pública, uma vez que esses microrganismos podem carrear genes de resistência a múltiplas drogas que podem ser transportados por elementos genéticos móveis, possibilitando, desta forma, a disseminação desses genes no ambiente, inclusive água e alimentos. Essa transferência é muito importante para a bactéria, pois permite que esta sobreviva em um amplo número de habitat (GORDON et al., 2008).

As β -lactamases são a causa principal de resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Estas enzimas são frequentemente produzidas por bactérias Gram-positivas e negativas e tem como função catalisar a hidrólise da ligação amida do anel β -lactâmico causando a destruição irreversível da atividade antibactericida

destes antibióticos, tendo como consequência a resistência bacteriana (OVERMAN et al., 1998; TAVARES, 2001). No quadro 5 apresenta a classificação das β -lactamases segundo os critérios de BUSH-JACOBY-MEDEIRO (1995), de AVISON et al., 2000 e BUSH-JACOBY (2009).

Com o avanço dos estudos moleculares foi observado que os mecanismos de resistência aos antibióticos são codificados geneticamente tanto nos cromossomos como em elementos extra cromossômicos bacterianos (KO et al., 1998).

As enzimas β -lactamases recebem nomenclatura relacionada ao tipo de substrato sobre o qual atuam, como por exemplo, as β -lactamases Oxa-1, Oxa-2 e Oxa-3 cujos substratos são as isoxazolilpenicilinas e a metecilina.

Essas enzimas podem também ser nomeadas em função da espécie bacteriana produtora, como por exemplo, as β -lactamases PSE-1, PSE-2, PSE-3 e PSE-4 que tem atividade de carbenicilinase e são produzidas por *Pseudomonas*, ou ainda recebem denominação ligada a nomes próprios, como nos casos da β -lactamases TEM-1 relacionada com o nome Temoniera, de uma paciente na Grécia da qual foi isolada uma cepa de *E.coli* resistente a ampicilina (TAVARES, 2001).

Muitas das β -lactamases produzidas por bactérias Gram-negativas têm seus códigos genéticos situado em transposons. Desta maneira, a origem genética da enzima pode ser transferida para diferentes plasmídios como também para os cromossomos (TAVARES, 2001).

Isso pode trazer benefícios para os microrganismos Gram-negativos, já que na maioria das vezes as β -lactamases são codificadas por genes plasmidiais possibilitando à bactéria produzir maiores quantidades de enzima permitindo que uma mesma bactéria produza enzimas com dupla origem genética (TAVARES, 2001).

A resistência induzida pelos antibióticos β -lactâmicos entre os bacilos Gram-negativos resulta da diminuição da repressão da síntese de β -lactamases, isso ocorre com a interação entre os antibióticos com um repressor dentro da célula. A desrepressão induzida é reversível com a retirada da droga, ao contrario do que ocorre com mutantes que também podem surgir na vigência do uso destes antibióticos. Os mutantes são capazes de manter a característica da resistência induzida (TAVARES, 2001).

Quadro 5 Descrição das características de β -lactamases produzidas por bactérias segundo sua classificação, substrato em que atuam e existência de inibidores.

Bush-Jacoby (2009)	Bush-Jacoby-Medeiro (1995)	Classificação (Classe/sub-classe)	Substrato	Inibido por		Características	Enzimas representantes
				*CA ou TZB	** EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidrolisam cefalosporinas e cefamicinas	<i>E.coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1, CepH, CAV-1
1e	***NI	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidrolisam mais ceftazidima que outras oximino- β -lactâmicos	GC1, CMY-37
2 ^a	2a	A	Penicilinas	Sim	Não	Hidrolisam mais benzilpenicilinas que cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	Penicilinas e cefalosporinas	Sim	Não	Hidrolisam benzilpenicilinas e cefalosporinas igualmente	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de espectro estendido e monobactâmicos	Sim	Não	Hidrolisam oximino- β -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	Não	Não	Resistentes ao ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	***NI	A	Cefalosporinas de espectro estendido e monobactâmicos	Não	Não	Hidrolisam oximino- β -lactâmicos combinados com resistência ao ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM -50
2c	2c	A	Carbenicilinas	Sim	Não	Hidrolisam carbapenêmicos	PSE-1, CARB-3
2ce	2d	A	Carbenicilinas e cefepimes	Sim	Não	Hidrolisam carbapenêmicos, cefepimes	RTG-4

Fonte: AVISON et al., 2000, BUSH e JACOBY, 2009. *CA: ácido clavulânico; **EDTA: ácido ethylenediamina tetraacetil; ***NI: não incluído

Quadro 5 Descrição das características de β -lactamases produzidas por bactérias segundo sua classificação, substrato em que atuam e existência de inibidores (Continuação).

Bush-Jacoby (2009)	Bush-Jacoby-Medeiro (1995)	Classificação (Classe/sub-classe)	Substrato	Inibido por		Características	Enzimas representantes
				*CA ou TZB	** EDTA		
2d	***NI	D	Cloxacilinas	Variável	Não	Hidrolisam as cloxacilinas ou oxacilinas	OXA-1, OXA-10
2de	***NI	D	Espectro estendido de cefalosporinas	Variável	Não	Hidrolisam a cloxacilinas ou oxacilinas e oximino- β -lactâmicos	OXA-11, OXA-15
2df	***NI	D	Carbapenêmicos	Variável	Não	Hidrolisam cloxacilinas ou oxacilinas e carbapenêmicos	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de espectro estendido	Sim	Não	Hidrolisam as cefalosporinas, não hidrolisam os aztreonans	CepA
2f	2f	A	Carbapenêmicos	Variável	Não	Hidrolisam os carbapenêmicos, oximino- β -lactâmicos e cefamicinas	KPC-2, IMI-2, SME-1
3 ^a	3	B/B1 B/B3	Carbapenêmicos	Não	Sim	Hidrolisam os antibióticos de amplo espectro incluindo os carbapenêmicos, mas não monobactâmicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B/B2	Carbapenêmicos	Não	Sim	Preferencialmente hidrolisam os carbapenêmicos	CphA, Sfh-1, ImiS
***NI	4	Desconhecida				Enzimas não sequenciadas e nem se encaixam em outros grupos	

Fonte: AVISON et al., 2000, BUSH e JACOBY, 2009. *CA: ácido clavulânico; **EDTA: ácido ethylenediamina tetraacetil; ***NI: não incluído

1.4.1 Metallo- β -lactamases

As metallo- β -lactamases são capazes de aumentar muito os casos de resistência às cefalosporinas de espectro estendido no ambiente hospitalar, uma vez que essas enzimas possuem um amplo espectro de atividade contra a maioria dos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, além de apresentarem resistência aos inibidores de β -lactamases.

As carbapenemases do tipo MBL pertencem à classe B de Ambler e necessitam de zinco ou de outro cátion divalente como cofator para ocorrência de sua atividade, ao contrário das outras β -lactamases que precisam de serina em seu sítio ativo (PELEG et al., 2005; DALMARCO, 2006). As metallo- β -lactamases são produzidas intrinsecamente por várias espécies de bactérias, inclusive as espécies do gênero *Aeromonas*.

Estes antibióticos são amplamente usados contra infecções nosocomiais (MENDES et al., 2006). Os carbapenêmicos mais utilizados nas terapias são imipenens e meropenens e são escolhidos quando ocorrem infecções graves por bactérias resistentes aos demais β -lactâmicos (PELEG et al., 2005).

As MBLs possuem quatro características principais:

- Possuem atividade contra os carbapenêmicos;
- Não hidrolisam os monobactâmicos
- Não hidrolisam os aztreonans;
- São inibidas por agentes quelantes, como EDTA (ácido etilenodiamenotetrácético), derivados do tiol (ácido mercaptoacético, mercaptocarboxílico, 2-mercaptopropiônico), metais pesados como Hg II, Fe II, Cu II, ácido succínico e o ácido dicopilínico (DALMARCO et al., 2006; MENDES et al., 2006).

As metallo- β -lactamases podem ser divididas em três subclasses: B1, B2 e B3. As classes B1 e B3 possuem uma ampla capacidade de hidrolisar vários β -lactâmicos (BEBRONE et al., 2005). As enzimas da subclasse B1 como o IMP-1, o VIM-2 e VIM-4 são dependentes de um ou dois zínco no seu sítio ativo para ter a capacidade de hidrolisar as penicilinas (penicilinas, carbenicilinas e ampicilinas), as

cefalosporinas e os imipenens, e são enzimas que representam o grupo 3a (BUSH, 1998 e HORSFALL et al., 2007).

A subclasse B2 contém as enzimas CphA que possui a capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos e apresenta pouca atividade sobre as penicilinas e cefalosporinas (BEBRONE et al., 2005). A CphA é ativada ao se ligar a um íon zinco e inibida ao se ligar a um segundo íon zinco (BUSH, 1998; BEBRONE et al., 2005; HORSFALL, 2007). Também parece que a expressão do gene *cphA* ou *ampH* pode ser induzida pelo imipenem e pelos inibidores de β -lactamases, tais como o ácido clavulânico e o tazobactam (SAAVEDRA et al., 2007).

A subclasse B3 é ativada ao se ligar a dois íons zinco e possui alta atividade de cefalosporinase (BUSH, 1998, HORSFALL, 2007).

As MBLs já foram observadas inseridas em estruturas genéticas que fornecem mobilidades aos genes, fazendo com que essas enzimas passem a ser conhecidas como MBLs móveis ou MBLs adquiridas. Já foram descritas cinco classes de MBL adquiridas: IMP (Imipenemase), VIM (Verono imipenemase), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase), GIM (German imipenemase), SIM-1 (Seul Imipenemase) (MENDES et al., 2006).

As MBLs VIM, IMP, SPM, GIM e SIM são enzimas que têm amplo substrato e conferem ao microrganismo resistência aos β -lactâmicos com exceção do aztreonam (PELEG et al., 2005).

As MBLs adquiridas são codificadas por cassetes gênicos localizados nos cromossomos ou plasmídios bacterianos. No entanto, com exceção da enzima SPM-1 que é codificada por um gene localizado em plasmídios. As demais MBL adquiridas são codificadas por genes localizados em integrons de classe 1 (MENDES et al., 2006).

1.4.1.1. IMP – Imipenemase

IMP -1 (primeiro MBL móvel) é uma metalo- β -lactamase codificada pelo gene *bla_{IMP}*, que é responsável pela sua produção. Este gene normalmente está inserido num integron que é carregado por um plasmídio. Já foram observadas transferências do cassete do gene *bla_{IMP}* para várias bactérias Gram-negativas

(ARAKAWA et al., 2000; MENDES et al., 2006). A IMP-1 causa a resistência a vários β -lactâmicos de amplo espectro como as cefalosporinas, cefamicinas e os carbapenêmicos (ARAKAWA et al., 2000).

Os carbapenêmicos são muito usados como um potente agente contra infecções causadas por bactérias Gram-negativas devido a sua afinidade com PBP-2 (proteína ligadora da penicilina) e pela sua capacidade de atravessar a camada mais externa destas bactérias (HIRAKATA et al., 1998).

As enzimas imipenemases fazem parte do grupo funcional 3a de Bush e são capazes de hidrolisar as cefalosporinas, cefamicinas, penicilinas e carbapenêmicos (HIRAKATA et al., 1998).

Foram descritos 27 tipos de IMP (BUSH e JACOBY, 2010), sendo que essas enzimas conferem resistência à ceftazidima, cefoxitina e cefazolina e reduz a suscetibilidade bacteriana aos carbapenêmicos (NEUWIRTH et al, 2007).

1.4.1.2 VIM- Verona Imipenemase

A enzima VIM-1 foi descrita e isolada em *Pseudomonas aeruginosa* pela primeira vez em Verona, Itália e posteriormente observada no Japão. A enzima produzia resistência à ceftazidima, imipenem, carbapenêmicos e a todos os outros β -lactâmicos, exceto monobactâmicos. O gene *bla*_{VIM-1} é carregado por um cassete gênico inserido em um integron de classe 1 (FRANCESCHINI et al., 2000 e SCHEFFER, 2008).

Já foram descritas 24 variantes de Verona Imipenemases tanto em plasmídios quanto no cromossomo bacteriano (MENDES et al., 2006; BUSH e JACOBY, 2010).

1.4.1.3 SPM – São Paulo metalo- β -lactamase

A SPM-1 foi isolada de *P. aeruginosa* e apresenta uma inserção de 24 aminoácidos logo após o sítio de ativação. Essa inserção provavelmente aumente a hidrólise do anel β -lactâmico. O gene *bla*_{SPM-1} não está associado à integrons ou transposons, mas sim ao elemento CR (região comum), fazendo parte do genoma

móvel de um plasmídio de aproximadamente 180Kb. A função do CR é facilitar a mobilidade do gene *bla*_{SPM-1} (SCHEFFER, 2008).

1.4.1.4 GIM – German Imipenemase

A GIM-1 foi isolada de *P. aeruginosa* e tem a capacidade de degradar os antibióticos carbapenêmicos. O gene *bla*_{GIM-1} foi descrito como inserido em um plasmídio não conjugativo o que provavelmente o torna pouco móvel quando comparado aos demais genes codificadores de metalo- β -lactamases (CASTANHEIRA et al., 2004; SCHEFFER, 2008).

1.4.1.5 SIM-1 – Seul Imipenemase

A Seul Imipenemase foi descrito em *Acinetobacter baumannii* na Coreia do Sul e seu gene codificador *bla*_{SIM-1} estava presente em um integron de classe 1. O referido integron possuía também outros cassetes que raramente são observados em integrons que codificam metalo- β -lactamases, gene *arr-3* (rifampicina ADP ribosiltransferase) e gene *catB3* (cloranfenicol-acetiltransferase) (MENDES et al., 2006).

1.4.2 β -lactamase de Espectro Estendido (ESBL)

As ESBLs são mutantes derivados de β -lactamases de amplo espectro e contém em seu sítio ativo uma serina. São mediadas por plasmídios, sendo que os organismos produtores de ESBLs são resistentes à amino-penicilinas, carboxi-penicilinas e ureido-penicilinas, e também todas as cefalosporinas, incluindo as de quarta geração, penicilinas isoladas e monobactâmicos (aztreonam), mantendo a sensibilidade aos carbapenêmicos e cefoxitina. As associações piperacilina/tazobactam ou ticarcilina/clavulanato podem mostrar atividade contra os microrganismos produtores de β -lactamases de espectro estendido (NAAS et al., 1998, TAVARES, 2001, KHAN et al., 2008).

Estas enzimas não são induzíveis e estão principalmente relacionadas aos tipos TEM grupo que possui atualmente 181 enzimas descritas (BUSH e JACOBY, 2010).

Além do grupo TEM, outras ESBLs foram descritas. A enzima β -lactamase de espectro estendido CTX-M pertence à classe A e apresenta alta atividade contra a cefotaxima e outros substratos como a ceftazidima, ceftriaxona, e cefepima (HOPKINS et al., 2006). De acordo com BUSH e JACOBY (2010) existem relatos de pelo menos 93 desta β -lactamase sendo possível a sua divisão em grupos filogenéticos com base na sequência de aminoácidos (HOPKINS et al., 2006). Muitos genes codificadores de CTX-M estão situados próximos ou dentro de transposons ou de cassetes gênicos possibilitando sua rápida disseminação (HOPKINS et al. 2006).

OXA é uma enzima ESBL capaz de hidrolisar a oxacilina, cloxacilina, metilicilina, amoxicilina e cefalotina; estas enzimas são normalmente observadas em *P. aeruginosa*. As enzimas OXA estão classificadas na classe D de Ambler e possuem um sítio ativo dependente de serina (NAAS et al., 1998).

As 32 enzimas descritas (BUSH e JACOBY, 2010) se diferenciam por um único aminoácido e os genes que as codificam, com exceção dos genes *oxa*₁₂ e *oxa*₁₈, sendo localizados em integrons (NAAS et al., 1998). A OXA-18 é capaz de hidrolisar amoxicilina, ticarcilina, cefalotina, ceftazidima, cefotaxima e aztreonam, mas não imipenem ou cefamicina, sendo totalmente inibida por ácido clavulânico (NAAS et al., 1998).

NAAS et al. (1998) descreveram uma enzima denominada OXA-20 que é parcialmente inibida pelo ácido clavulânico, possui espectro restrito e hidrolisa somente a oxacilina.

O espectro hidrolítico da OXA-22 é limitado muitas vezes por benzilpenicilina, cloxacilina e cefalosporina e o gene que codifica esta enzima foi observado inserido no cromossomo (NORDMANN et al., 2000).

Outra enzima ESBL é a CMY-1 que possui ação sobre as cefalosporinas de segunda e terceira gerações, incluindo a ceftazidima e aztreonam (monobactâmicos) (NAAS et al., 1998, TAVARES, 2001). Com os avanços dos estudos houve um

aumento nos relatos dos microrganismos produtores das ESBLs bem como das enzimas descritas nesses organismos (KHAN et al., 2008).

1.4.3 Cefalosporinas

As β -lactamases do grupo funcional 1 da classe molecular C são originalmente enzimas chamadas de cefalosporinas cromossomais ou AmpC de *Pseudomonas aeruginosa* ou *Enterobacteriaceae*. Na ausência de β -lactâmicos, as β -lactamases AmpC, que normalmente são produzidas naturalmente em pequenas quantidades, passam a produzi-las em grandes quantidades na presença de ampicilina ou cefoxitina devido a uma mutação que ocorre no gene codificador dessas enzimas. Essa mutação torna a resistência constitutiva (TAVARES, 2001, REISBIG, et al., 2004). Quando a AmpC é produzida em grandes quantidades (hiper-expressão de AmpC), ocorre à resistência a quase todos os β -lactâmicos com exceção da quarta geração das cefalosporinas (cefepime, cefpirome) e dos carbapenêmicos (REISBIG et al., 2004).

As AmpCs podem ser induzíveis em espécies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Pseudomonas aeruginosa* o que pode ocasionar a resistência do microrganismo, anteriormente sensível, durante o curso da terapêutica com cefoxitina ou cefalosporina da terceira geração (TAVARES, 2001).

Embora denominadas cefalosporinas cromossomais, é crescente o número de relatos de enzima AmpC associada à plasmídios (REISBIG, et al., 2004). Essas enzimas já foram relatadas na África, Ásia, Europa e Américas (HOPKINS et al., 2006).

Oitenta e oito enzimas da família AmpC já foram descritas (BUSH e JACOBY, 2010), os genes dessa família já foram observados inseridos em plasmídios ou como parte de um transposon (HALDORSEN et al., 2008).

Algumas dessas enzimas foram estudadas nesse trabalho, são elas a enzima CMY que já foram descritas 52 variantes; a ACC que possui 4 variantes, a ACT que possui 8 variantes; a DHA que possui 4 variantes, a FOX que possui 7 variantes; a LAT que

não possui variantes a MIR que possui 5 variantes e a MOX que possui 8 variantes (BUSH e JACOBY, 2010).

As AmpCs são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico e podem ser diferenciadas das ESBLs pela sua capacidade de hidrolisar cefamicinas (KHAN et al., 2008).

1.5 OUTROS MEIOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

1.5.1 Alteração nas Porinas

As proteínas de membranas externas (OMPs) ou porinas das bactérias Gram-negativas são capazes de formar canais que permitem a difusão de solutos hidrofílicos através da membrana externa para a parte interna da célula. A perda ou a diminuição da expressão dos genes que codificam a OMP causam a redução da entrada de antibióticos na célula, diminuindo a concentração interna do antimicrobiano o que pode conferir resistência aos antibióticos (LIVINGSTONE et al., 1995).

A alteração da permeabilidade da membrana externa só ocorre em Gram-negativos, e geralmente é acompanhada da produção de β -lactamases. A perda de um ou mais canais da membrana externa pode implicar em altos níveis de resistência, se estiver associada à inativação enzimática. A perda das porinas OmpC e OmpF como causa de resistência tem sido relatada principalmente em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. A associação entre perda de porinas e resistência ao imipenem foi descrita em cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ACT-1, uma β -lactamase tipo AmpC mediada por plasmídios (NOGUEIRA, 2005). Em outros membros da família *Enterobacteriaceae*, a resistência aos carbapenêmicos também tem sido relacionada à diminuição da permeabilidade da membrana externa, associada à hidrólise pela hiperprodução de β -lactamases cromossômicas (NOGUEIRA, 2005).

Diferentes porinas podem ser encontradas na membrana externa de isolados de *P. aeruginosa*, como a OprF, OprC, OprD e OprE. Dentre essas, a mais abundante

é a OprF que é, provavelmente, a mais utilizada pela maioria dos β -lactâmicos para penetrar no interior da bactéria. Contudo a proteína OprD parece estar mais envolvida na penetração dos carbapenêmicos, especialmente de imipenem nessas enterobactérias (HANCOCK e BRINKMAN, 2002).

1.5.2 Hiperexpressão da Bomba de Efluxo

A hiperexpressão da bomba de efluxo é um sistema que faz com que diminua a quantidade de antibióticos dentro da célula bacteriana, tornando muitas vezes essas bactérias resistentes (LIVINGSTONE et al., 1995). Os genes que codificam normalmente este sistema estão no genoma bacteriano e, portanto, podem causar uma resistência intrínseca do microrganismo, sem a necessidade de adquirir novos genes, no entanto, sabe-se que as bactérias podem adquirir esse gene de outras bactérias (LIVINGSTONE et al., 1995).

Para ocorrer a hiper-expressão da bomba de efluxo é necessário que ocorra uma mutação ou mesmo deleções nos genes reguladores desse sistema. Em *P. aeruginosa* já foram descritos quatro principais sistemas de efluxo: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEFOprN, MexXY-OprM (HANCOCK e BRINKMAN, 2002).

A bomba de efluxo não é específica e pode funcionar para antibióticos de classes diferentes. Sendo assim, esse tipo de resistência pode também ser relacionado com outros antimicrobianos, podendo ser a causa da resistência intrínseca natural às fluoroquinolonas observada em *Bacteroides fragilis*. Este mesmo mecanismo é também um dos responsáveis pela resistência de cepas de *Straphylococcus* aos antibióticos macrolídeos e estreptomicinas, e depende de genes induzíveis localizados em plasmídios (TAVARES, 2001).

1.5.3 Alteração nas Proteínas Ligadoras de Penicilinas (PBPs)

As PBPs são proteínas situadas na face externa da membrana citoplasmática bacteriana, que possuem atividade enzimática de transglicosidases, transpeptidases, carboxipeptidases e endopeptidases, participando de maneira fundamental na terceira etapa da biossíntese das novas moléculas de peptidoglicano e sua incorporação

preexistente na parede celular da bactéria em multiplicação (TAVARES, 2001). As proteínas ligadoras de penicilinas são carboxipeptidase localizadas na membrana citoplasmática bacteriana que atuam em uma etapa importante da estruturação do peptideoglicano das bactérias, catalisando as transpeptidases. O peptidoglicano é um constituinte importante da parede celular (LIVINGSTONE et al., 1995).

Essas proteínas são sítios-ativos que se ligam aos antibióticos, permitindo sua passagem para dentro da célula. Uma mutação nesta estrutura resulta na impermeabilidade da membrana que passa a não permitir que o antibiótico passe para dentro da célula. As PBPs constituem o receptor de ação dos antibióticos β -lactâmicos (CATTOIR et al., 2008).

As PBPs correspondem a 1% das proteínas de membrana citoplasmática e são divididas em frações principais, separadas de acordo com seu peso molecular. As PBPs de alto peso molecular PBPs 1, PBPs 2 e 3, estão presentes em pequena quantidade na célula, porém são as principais enzimas envolvidas na síntese do peptidoglicano (TAVARES, 2001).

Já as de baixo peso molecular, PBPs 4, 5 e 6, representam de 70% a 90% das PBPs de uma bactéria como a *E. coli*, e não são necessárias à viabilidade da célula funcionando secundariamente na síntese da parede celular (TAVARES, 2001).

A ação dos antibióticos β -lactâmicos em seus receptores depende não só de sua afinidade pelas PBPs, mas também da possibilidade de as drogas chegarem ao seu local de ação. Desta maneira, é necessário que a membrana externa do microrganismo seja permeável aos antibióticos e que estes cheguem íntegros aos seus receptores. Muitas bactérias resistentes aos antibióticos β -lactâmicos produzem β -lactamases, que inativam a droga no espaço periplasmático, alterando a integridade da molécula de ligação as PBPs (TAVARES, 2001).

Os antibióticos β -lactâmicos interferem na síntese do peptideoglicano. A ligação desses antimicrobianos às proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) prejudicam o alongamento e a divisão celular, além de promoverem a liberação de autolisinas provocando a morte das células bacterianas (NOGUEIRA, 2005).

São quatro os tipos de alterações nas PBPs e que causam resistência aos antibióticos β -lactâmicos (TAVARES, 2001).

1. Ausência ou diminuição, no mutante resistente, da principal PBP de ligação do antibiótico, como observado, por exemplo, em mutantes do *C. perfringens* resistentes à penicilina G, que apresentam redução na quantidade da PBP 1.
2. Produção aumentada de uma PBP de menor importância na ação do antibiótico, deslocando a ligação do β -lactâmico de sua PBP alvo primário de ação, como verificado, por exemplo, nos *Enterococcus* superprodução da PBP 5, de menor reatividade enzimática.
3. Produção de uma PBP adicional com pequena afinidade de ligação ao antibiótico, como observado, por exemplo, em mutantes de *S. aureus* metilicina-resistentes, nos quais ocorre o surgimento de uma nova PBP-2, PBP-2' ou PBP 2a, que substitui a ação das PBP -1, -2 e -3.
4. Modificação na constituição da PBP alvo primária do antibiótico, conforme observado em cepas de *H. influenzae* resistentes à ampicilina ou em mutantes de *E. coli* resistentes às cefalosporinas.

A resistência ao imipenem pode estar relacionada às alterações nas PBPs em *Enterobacter aerogenes*. As mutações que alteram essas estruturas fazem com que essas passem a apresentar baixa afinidade de ligação aos antibióticos β -lactâmicos, ou levam à produção de PBPs suplementares com baixa afinidade de ligação, capazes de substituir as PBPs que se encontram inibidas (NOGUEIRA, 2005).

Embora o mecanismo de ação da penicilina ainda não tenha sido completamente determinado, a sua atividade bactericida inclui a inibição da síntese da parede celular e a ativação do sistema autolítico endógeno da bactéria. A ação da penicilina depende da parede celular, que contém na sua composição peptidoglicano. Durante o processo de replicação bacteriana, a penicilina inibe as enzimas que fazem a ligação entre as cadeias peptídicas, impedindo, portanto, o desenvolvimento da estrutura normal do peptidoglicano (TAVARES, 2001).

1.6 Elementos de DNA

1.6.1 Integrans

Os integrans constituem uma família bem diversificada de elementos genéticos e podem ser encontrados em muitas bactérias Gram-negativas e gram-positivas. São elementos que contêm um sistema de sítio específico de recombinação que é capaz de capturar genes (XU et al., 2007).

Integrans associados aos cassetes gênicos são encontrados em vários elementos móveis como os transposons e plasmídios que possibilitam a transferência horizontal do material genético das bactérias (XU et al., 2007).

A maioria dos integrans encontrados em isolados clínicos pertencem à classe 1. Já foram descritas outras classes de integrans, como as classes 2, 3 e 4. Os membros destas classes possuem suas respectivas integrases: *intI1*, *intI2*, *intI3* e *intI4*, as quais compartilham similaridade entre 35% e 94% (MENDES et al., 2006).

Integrans da classe 1 são elementos genéticos constituídos de uma região conservada 5' (5-CS), que inclui um gene *intI1*, responsável pela inserção e associação do cassete gênico; região promotora, responsável pela transcrição do cassete gênico; um sítio de recombinação (*attI1*); uma região conservada 3' (3-CS); e um quadro de leitura aberto (ORF5) cuja função não se conhece (MENDES et al., 2006; XU et al., 2007).

A classe 2 dos integrans é formada por uma integrase defeituosa e incapaz de promover a mobilização de cassetes gênicos (MENDES et al., 2006).

O integron de classe 3 é caracterizado por conter os genes da metalo- β -lactamase e um aminoglicosídeo acetiltransferase (XU et al., 2007). Esta classe não tem sido associada a um transposon, mas contém o cassete gênico *bla_{IMP}* que confere resistência aos carbapenêmicos (CARATTOLI et al., 2003).

E por último o integron de classe 4 cuja integrase foi observada em um pequeno cromossomo de *Vibrio cholerae* e está associado a genes de virulência (CARATTOLI et al., 2003).

Os integrons são elementos de DNA que podem mediar a disseminação dos genes de resistência a antibióticos através de um sistema específico de sítio de recombinação (MESSIER e ROY, 2001).

Os cassetes gênicos são pequenas estruturas móveis que geralmente possuem entre 500 e 1.000 nucleotídeos e são constituídos por dois componentes funcionais: um gene, responsável pela codificação de alguma proteína bacteriana, e um sítio de recombinação. O cassete gênico não possui promotor, sendo, portanto, dependente do promotor presente no integron, no qual o cassete gênico se encontra inserido (MENDES et al., 2006).

Esses cassetes gênicos são pequenas estruturas móveis, repetitivas, não se replicam e são associados, comumente, a integrase específica, *attC* ou elemento 59be. (HALL e COLLIS, 1998).

A inserção dos cassetes é catalisada por um sítio específico, recombinase, (*IntI*) que está no integron. Já foram observados cassetes gênicos em três classes de integron (HALL e COLLIS, 1998).

A recombinase *IntI* 1 catalisa a inserção e integração dos genes de resistência aos antibióticos no integron de classe 1, por um sistema de recombinação de sítio específico, sendo o sítio específico do *IntI* responsável pela movimentação do gene cassete (MESSIER e ROY, 2001).

Os transposons são seqüências de DNA móveis transportadas pelos plasmídios responsáveis pela transferência de informações genéticas de resistência aos antibióticos em bactérias Gram-negativas (LIEBERT et al., 1999).

Um grupo importante de transposons é conhecido como Tn 21, e está envolvido na resistência ao mercúrio, e carrega um gene *tnp* envolvido na sua própria transferência e o operon *mer* responsável pela resistência ao mercúrio (LIEBERT et al., 1999). O Tn21 é normalmente observado associado ao integron de classe 1 e juntos estão amplamente distribuídos em bactérias Gram-negativas (CARATTOLI et al., 2003).

Outro grupo de transposon conhecido é o Tn7 que foi descoberto em *Escherichia coli* e só ativa a transposição quando encontra um alvo específico. As proteínas TnsA, TnsB, TnsC constituem o centro da maquinaria do transposon que interagem com o alvo quando então, entram em ação as TnD e TnE que realmente

fazem a transposição (PARKS e PETERS 2007). Esse transposon tem sido associado com a classe 2 de integrons (CARATTOLI, 2003).

1.7 RESISTÊNCIA EM *Aeromonas*

As resistências das bactérias do gênero *Aeromonas* são estudadas tanto nos organismos proveniente do meio ambiente como de casos clínicos. Já foram descritas algumas enzimas de resistência a antibióticos produzidas por esse gênero como as metalcarbapenemases - CphA (classe B), a cefalosporinases - CepH (classe C) e a oxacilinases - AmpH (classe D), e mais especificamente em *A. caviae* foi descrita a enzima CAV-1, em *A. hydrophila* o CepH, em *A. jandaei* a AsbA1 e em *A. veronii* o CepS (LUCA et al., 2010). O gene *cepH* codificador da enzima produzida por *A. hydrophila* foi detectado no Brasil, em amostra ambiental por BALSALOBRE et al. (2009a).

CAV-1, uma enzima do tipo AmpC parecida com a FOX, foi descrita por FOSSE et al. (2003) em isolados de *Aeromonas*. *A. caviae* que possuía essa enzima apresentava resistência à ação dos antibióticos amoxicilina, ticarcilina e cefalosporina.

Em estudos com as metalo- β -lactamases, NEUWIRTH et al. (2007) descreveram um isolado de *A. caviae* na França que possuía o gene *bla*_{IMP-19} inserido em um integron de classe 1.

Posteriormente LIBISCH et al. (2008) descreveram o gene *bla*_{VIM-4}, carregado por um integron em *A. hydrophila* de um paciente com diarreia na Ucrânia. E mais recentemente BALSALOBRE et al. (2009a) detectaram a presença dos genes intrínsecos (*cphA*) em *A. hydrophila* e *A. jandaei* em amostras ambientais, no Brasil.

Já foram descritas algumas enzimas do tipo ESBL em *Aeromonas* como CTX-M-1, CTX-M-3, TEM-24, PER-1 e PER-6. Um desses estudos foi realizado por YE et al. (2010) que estudaram uma *A. caviae* multiresistente coletada de um paciente com pneumonia e nesse organismo foi verificada a presença de TEM-1 (β -lactamase), CTX-M-3 (ESBL), MOX-4 (AmpC β -lactamase).

TEM-24 e CTX-M-1 foram identificados em *A. hydrophila*, PER-1 em *A. media*, PER-6 em *A. allosaccharophila*. O gene *bla*_{PER-1} foi identificado em um transposon (Tn1213) e o gene *bla*_{PER-6} foi observado no cromossomo da *A. allosaccharophila* (GIRLICH et al., 2010). Já o gene da enzima PER-1 foi encontrado em *Aeromonas media* coletadas de um reservatório ambiental (PICÃO et al., 2008a).

O gene *bla*_{TEM-24} foi encontrado em uma *Aeromonas* sp. inserido em num plasmidio (MARCHANDIN et al., 2003).

E mais recentemente foi descrito *bla*_{TEM-116} de origem cromossomal em *A. hydrophila* e *A. jandaei*, em isolados de amostras ambientais no Brasil, o qual não apresentou perfil ESBLs (BALSALOBRE et al., 2010).

No estudo de AOKI et al. (1987) foi observada a resistência de um isolado de *A. hydrophila* à tetraciclina que era codificada pelo gene *tet* mediado por plasmidio R. Em estudos mais recentes de BALASSIANO et al. (2007) os autores constataram a presença dos genes *tetA* e *tetE* em *Aeromonas* provenientes de amostras de alimento e também de amostras clínicas.

Outro antibiótico para os quais as bactérias estão se tornando resistente são as quinolonas, essa resistência poder ser codificada pela presença do gene *gmrS2*. O gene *gmrS2* foi identificado em isolados de *A. caviae* e *A. allosaccharophila*, integrado em um cassete gênico (CATTOIR et al., 2008; PICÃO et al., 2008b).

No trabalho de PALÚ et al. (2006) observaram alta prevalência de resistência e de plasmídios em isolados de *Aeromonas* provenientes de alimento no Brasil. Esses autores estudaram 83 *Aeromonas* coletadas de fezes de humano e de verduras frescas e observaram que os organismos estudados apresentaram resistência aos antibióticos do tipo ampicilina/sulbactam, cefoxitina e a tetraciclina.

No estudo de COSTA et al. (2003), 57 isolados de *Aeromonas* provenientes de penas, fezes, carcaças não evisceradas, carcaças evisceradas, frango refrigerado e da água do pré-arrefecimento do matadouro de frangos, em São Luís (MA) eram resistentes a ampicilinas, cefalotinas, tetraciclinas e aos sulfazotríns.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Confirmar o posicionamento taxonômico e investigar a ocorrência de genes de resistência a antibióticos e de virulência em cepas de *A. caviae*, *A. aquariorum* e *A. sanarellii* isoladas de amostras ambientais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar os testes fenotípicos com os testes genotípicos na determinação taxonômica de isolados de *A. aquariorum*, *A. caviae* e *A. sanarellii* isoladas de amostras ambientais.
2. Pesquisar a existência dos genes de resistência a antibióticos β -lactâmicos e de genes de virulência associados à patogenicidade em cepas de *A. aquariorum*, *A. caviae* e *A. sanarellii* isoladas de amostras ambientais.
3. Seqüenciar representantes obtidos para cada espécie de *Aeromonas*, para confirmação da espécie com base no banco de dados GenBank.
4. Discutir a importância para a saúde pública dos resultados obtidos quanto à presença de genes de virulência e resistência em cepas de *Aeromonas*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os 24 isolados de *Aeromonas* utilizados neste estudo foram do ano de 1995 a 2000 e são provenientes de amostras ambientais. Os isolados foram previamente identificados por provas fenotípicas e fazem parte da coleção de cultura do Laboratório de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública–USP.

Todos os isolados foram semeados em Agar amido para isolamento e confirmação de pureza e posteriormente armazenadas em microtubos com glicerol em freezer -70°C até o momento do uso.

3.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o método de CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) preconizado por MURRAY e THOMPSON, 1980 e descrito por AUSUBEL et al., 1995:

Cada um dos isolados foi semeado em tubo do tipo Falcow® contendo caldo Luria 0,5%, incubado por 18h a 37°C. Passado esse tempo, as culturas foram centrifugadas por 10 min a 5000 rpm. Foi descartado o sobrenadante e ressuspensão o sedimento, “pellet”, com água ultrapura (MilliQ®), transferido para um novo microtubo e centrifugado por 5 min a 10000 rpm.

Após esse tempo, foi novamente descartado o sobrenadante e ressuspensão o “pellet” com 567 µL de TEI (Tris 10mM, pH 8.0; EDTA 1mM, pH 8.0), 30 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e então adicionada a essa mistura 3 µL de proteinase K, que foi incubada a 37°C por 1h. Em seguida, em cada microtubo, foram adicionados 100µL de NaCl 5M, 80µL de CTAB pré aquecido e incubado a 65°C por 20min.

A mistura foi retirada do banho Maria e mantida em temperatura ambiente até o resfriamento. Em seguida foram adicionados 500µL de uma solução clorofórmio/álcool-isoamílico na proporção de 24:1, homogeneizada e levada por 25 min. para centrifugação a 10000rpm (24°C).

A fase aquosa da mistura foi removida e transferida para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 5 μ L de RNaseA e posteriormente incubada a 37°C por 1h.

Após o período de incubação, foi adicionado clorofórmio puro na mesma quantidade da mistura contida no microtubo, centrifugada novamente por 15 min a 10000 rpm. A fase aquosa foi novamente removida para um novo microtubo, sendo adicionado 1 mL de álcool isopropílico gelado, e homogeneizado por inversão até a precipitação do DNA. Em seguida os microtubos foram centrifugados por 5 min a 10000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se o etanol 70% gelado e centrifugou-se novamente por 5 min a 10000 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado e o DNA foi colocado para secar em dessecador. O DNA purificado foi ressuspensionado com TEII (Tris 10mM, pH 8.0; EDTA 0,1mM, pH 8.0) e armazenado a 4°C.

A verificação da qualidade do DNA extraído foi feita após 24h da adição do TEII por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2%, em intensidade de corrente de 6V/cm por 30 minutos. A partir da extração pelo CTAB foram feitas as reações em cadeias da polimerases (PCR).

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA POR CHOQUE TÉRMICO

A extração do material genético por choque térmico foi realizada pelo método descrito por CHAPMAN et al., 2001, onde 2 mL de cultura de 18 às 24h em caldo Luria 1%, de cada microrganismo em estudo, foram centrifugados por 10 minutos a 12000rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspensionado com 1mL de água ultrapura (MilliQ®) estéril. A mistura foi novamente centrifugada por 5 minutos a 12000rpm em temperatura ambiente e o sobrenadante descartado.

Ressuspendeu-se o “pellet” com 200 μ L de água ultrapura (MilliQ®) que foi mantido em banho 95°C por 10 minutos. Após esse período os microtubos foram imediatamente levados para freezer -20°C por 30 minutos.

Passado esse tempo foram retirados os microtubos do freezer e mantidos em temperatura ambiente até completo descongelamento. Depois de descongelados os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm em temperatura ambiente.

Os sobrenadantes foram transferidos para um novo microtubo de 1,5 mL e armazenado em freezer -20°C até o momento do uso.

3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

3.3.1 Confirmação do Gênero *Aeromonas*

A amplificação por PCR foi realizada a partir do DNA extraído pelo método de CTAB para confirmação do gênero *Aeromonas* utilizando iniciadores específicos, ciclos e condições descritos por UEHARA (2008), e apresentados no quadro 6. Em um volume final de 25µL de reação foram adicionados 250µL de DNA, tampão10X, 200uM de DNTPs, 0,2 uM de cada iniciador e 1,25U taq-DNA-polimerase.

3.3.2 Amplificação do 16S rDNA

A amplificação do fragmento 16S rDNA foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf), utilizando iniciadores específicos ciclos e condições de reação descritos por THOMPSON et al. (2001) e apresentados no quadro 6. Em um volume final de 25µL de reação, foram adicionados 250 µL de DNA, tampão10X, 200uM de DNTPs, 0,2 uM de cada iniciador e 1,25U taq-DNA-polimerase

3.3.3 Amplificação do gene *gyrB*

A amplificação do fragmento correspondente ao gene *gyrB* foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf), utilizando iniciadores específicos ciclos e condições de reação descritos por SOLER et al. (2004) e apresentados no quadro 6. Em um volume final de 25µL de reação foram adicionados 250 µL de

DNA, tampão 10X, 200uM de DNTPs, 0,2 uM de cada iniciador e 1,25U taq-DNA-polimerase.

3.3.4 Visualização dos produtos de PCR

Para a visualização da presença dos fragmentos esperados para organismos pertencentes ao gênero *Aeromonas*, foi utilizada a eletroforese em gel de agarose 1,2% em intensidade de corrente de 6V/cm, que foi corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta em sistema de captura de imagens Epi Chemi II Darkroom e o software Labworks. A determinação do peso molecular das bandas obtidas foi realizada pela comparação com um marcador de peso molecular de 100pb (MassRuler™ DNA Ladder, fermentas).

Para a reação da PCR dos genes *gyrB* e do iniciador Aero 16S foi utilizada a *Pseudomonas* sp. pertencente a coleção de cultura do laboratório de prática em saúde pública da Faculdade de Saúde Pública – USP como controle negativo da reação.

Quadro 6 Sequência dos iniciadores, e tamanho dos produtos esperados para a identificação dos organismos do gênero *Aeromonas*.

Gene	Sequência dos iniciadores	Condições de PCR						Tamanho da banda	Referência
		DI	NC	D	A	E	EF		
Aero 16S-F Aero 16S-R	5' GTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCAC 3' 5' AGCTTGCAGCCCTCTGTACGCGCCA 3'	95°C 7 min	25	95°C 1 min	65°C 1 min	72°C 1 min	72°C 5 min	797pb	UEHARA (2008)
16S F 16S R	5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' 5' GAGTTTGATCATGGCCTCAG 3'	95°C 7 min	35	95°C 2 min	55°C 1min	72°C 2min	72°C 10 min	1500bp	THOMPSON et al. (2001) Este estudo
<i>gyrB</i> F <i>gyrB</i> R	5' TCCGGCGGTCTGCACGGCGT 3' 5' GGGGTCACCTGCTTCACCAA 3'	94°C 7 min	35	94°C 30 seg	55°C 1 min	72°C 1 min	72°C 5 min	1500bp	SOLER et al. (2004)

DI – Desnaturação inicial; **NC** – Número de ciclos utilizados; **D** – Temperatura e tempo de desnaturação; **A** – Temperatura e tempo de anelamento;

E – Temperatura e tempo de extensão; **EF** – Tempo e temperatura de extensão final.

3.3.5 Identificação das Espécies

Os isolados confirmados como pertencentes ao gênero *Aeromonas* foram submetidos a uma triagem para as espécies do gênero *Aeromonas* de interesse no estudo utilizando a restrição do fragmento 16S rDNA com diferentes enzimas de restrição, de acordo com a metodologia descrita por UEHARA (2008). O quadro 7 apresenta as enzimas utilizadas, temperatura e tempo de incubação e inativação.

A visualização da presença do perfil de restrição, foi realizada em gel de agarose 3% em eletroforese com intensidade de corrente de 6V/cm. Os géis corado com brometo de etídio foram visualizado sob luz ultravioleta e documentados em equipamento Epi Chemi II Darkroom e software Labworks (UVP). O peso molecular das bandas dos perfis obtidos foram estimadas por comparação com marcador de peso molecular MassRuler™ DNA Ladder 100pb (Fermentas).

Quadro 7 Enzimas utilizadas na identificação das espécies de *Aeromonas* de interesse para esse estudo.

Enzima	Temperatura de incubação	Tempo de Incubação	Inativação	
			Temperatura	Tempo
<i>Pst</i> I	37°C	16 a 18 horas	65°C	15min
<i>Xho</i> II				
<i>Nru</i> I				
<i>Pvu</i> II				
<i>Snab</i> I				
<i>PshA</i> II				
<i>Tth</i> 111I	65°C		Não necessita	

3.4 DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA

Este procedimento foi realizado com DNA extraído pelo método de CTAB que foi submetido à reação de amplificação com iniciadores específicos previamente descritos e apresentados no quadro 8. As condições da PCR foram as seguintes: um ciclo inicial a 95°C por 5 minutos (desnaturação), 30 ciclos de 95°C por 1 minuto (desnaturação), 50°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão); além de um ciclo de extensão final de reação a 72°C por 5 minutos. Em um volume final de 25µL de reação, foram adicionados 250 µL de DNA, tampão 10X, 200uM de DNTPs, 0,2 uM de cada iniciador e 1,25U taq-DNA-polimerase.

Para a confirmação da presença do fragmento foi utilizado gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídio em eletroforese com intensidade de corrente de 6V/cm. A visualização dos fragmentos foi feita sob luz ultravioleta em equipamento fotodocumentador Epi Chemi II Darkroom e software Labworks (UVP). O peso molecular das bandas dos perfis obtidos foram estimadas por comparação com marcador de peso molecular MassRuler™ DNA Ladder 100pb (Fermentas).

Quadro 8 Sequência dos iniciadores, e tamanho dos produtos esperados para genes de virulência utilizados para estudo de organismos do gênero *Aeromonas*.

Gene	Iniciadores	Produto	Referência
<i>act/aerA/hlyA</i> F	5'-AGAAGGTGACYACCAAGAACA-3'	400pb	BALSALOBRE et al. (2009b)
<i>act/aerA/hlyA</i> R	5'-CCACTTCACTTCACCCGGGA-3'		
<i>alt</i> F	5'-ATCGGGGTGACCCTCACCTC-3'	764bp	SEN & RODGERS (2004)
<i>alt</i> R	5'-GGCAGGAACCTCGTTGACGAAGC-3'		
<i>ast</i> F	5'-TCTCCATGCTTCCCTTCCACT-3'	331pb	
<i>ast</i> R	5'-GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG-3'		

Para a realização da PCR para detecção de genes de virulência foram utilizados controles positivos, previamente caracterizados e pertencentes à coleção de

cultura do Laboratório de Prática de Saúde Pública – USP, para os genes: *act/aer/hlyA* cepa FSP196/08; *ast* cepa FSP225/08 e para o gene *alt* cepa FSP224/08.

3.5 ANÁLISE FENOTÍPICA DA SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

O teste de sensibilidade aos antibióticos imipenem, meropenem, ertapenem, cefotetan, cefoxitina, cefadizima, cefpodoxima, cefotaxima, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina, aztreonam, gentamicina, cefepime, ciprofloxacilina, ácido nalídixico foi realizado utilizando o método de disco-difusão em ágar Müller-Hinton de acordo com o Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de 2006.

Colônias de cada microrganismo em estudo foram transferidas para solução salina estéril em turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland e semeados, com o auxílio de um swab, na superfície de uma placa de petri contendo Agar Mueller Hinton, onde foram dispostos os discos contendo os antibióticos selecionados para o estudo.

Os antibiogramas foram incubados por 48 horas e a interpretação dos resultados foi considerada com base na medida dos halos de inibição de crescimento de cada microrganismo de acordo com o CLSI de 2009 para *Aeromonas hydrophila* complex, no entanto para aqueles antibióticos que não tem um *break point* para esse grupo foi usado o CLSI para as *Enterobacteriaceas*. Os isolados foram considerados sensíveis ou resistentes considerando os valores para cada antibiótico apresentado no quadro 9.

Quadro 9 Valores de halos considerados para os diferentes antibióticos utilizados no teste de disco difusão para determinação da sensibilidade aos antibióticos em isolados de *Aeromonas*.

Grupo/ antibióticos	Resistentes (halo em mm)	Intermediário (halo em mm)
Monobactâmicos		
Aztreonam (30µg)	15	16-21
Aminoglicosídeos		
Gentamicina (10µg)	12	13-14
Estreptomicina (10µg)	11	12-14
Tetraciclina		
Tetraciclina (30µg)	14	15-18
Fluoroquinolonas		
Ácido nalidixico (30µg)	13	14-18
Ciprofloxacina (5µg)	15	16-20
Fenicois		
Cloranfenicol (30µg)	12	13-17
Inibidor da via do folato		
Trimetoprim-sulfametoxazol (10µg)	10	11-15
Carbapenêmicos		
Imipenem (10µg)	13	14-15
Meropenem (10µg)	13	14-15
Ertapenem (10µg)	15	16-18
Cefens		
Cefotaxima (30µg)	14	15-17
Cefotetan (30µg)	12	13-15
Cefoxitina (30µg)	14	15-17
Cefpodoxima (10µg)	17	18-20
Ceftazidima (30µg)	14	15-17
Cefepime (30µg)	14	15-17

Fonte: CLSI 2006 e 2009.

3.5.1 Produção de ESBL

A observação da produção de ESBL (β -lactamase de espectro estendido) foi realizada pelo método de sinergismo descrito por BRADFORD, 2001. O método consistiu na combinação de discos dos antibióticos ceftazidima (30µg), cefotaxima

(30µg) e cefpodoxima (10µg) dispostos em uma placa de petri contendo ágar Müller-Hinton e no centro um disco de amoxicilina juntamente com ácido clavulânico (20/10 mg). O resultado positivo para a produção de ESBL foi observado quando ocorreu um sinergismo - formação de uma zona fantasma – entre o disco de amoxicilina/ácido clavulânico e o disco de cefalosporina utilizada.

Nos isolados produtores de AmpC foram colocados 400 µL/mL de cloxacilina no meio Müller Hinton (WELDHAGEN et al., 2004)

3.5.2 Produção de MBL

A produção de MBL foi avaliada pelo método de disco combinado dispostos em placa de petri contendo ágar Müller-Hinton como descrito por PITOUT et al., (2005). Os discos contendo os antibióticos imipenem (10µg), meropenem (10µg), e os mesmos antibióticos acrescidos de 5 µL de EDTA 0,5 M, foram utilizados lado a lado para o teste de sensibilidade. O mesmo procedimento foi efetuado, porém com a adição de 3µL de ácido mercaptoacético como inibidor. O resultado positivo para a produção de Metallo-β-Lactamase foi considerado quando ocorreu aumento superior a 7mm na zona de inibição do disco associado ao EDTA 0,5 M, e superior a 5 mm na presença de ácido mercaptoacético (ARAKAWA et al., 2000; PITOUT et al., 2005).

3.5.3 Produção de AmpC

A pesquisa de AmpC foi realizada por meio de testes de disco combinado em placa de petri contendo ágar Muller-Hinton. Foram utilizados discos de cefoxitina (30µg) e cefotetan (30µg), ambos com 20 µL de ácido fenilborônico (120mg de ácido fenilborônico em 3mL de dimetil-sufóxido e 3mL de água destilada estéril) dispostos sobre o meio de cultura com distância aproximada de 3mm entre os discos (COUDRON et al., 2000). O resultado positivo para a produção de Cefalosporinases foi considerado quando ocorreu aumento de 5mm na zona de inibição de um dos discos de antibióticos associados ao inibidor - ácido fenilborônico (BA) (COUDRON et al., 2000).

3.6 DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

3.6.1 Detecção dos genes MBLS: *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{CphA}, *bla*_{SPM-1}

A presença dos genes de resistência *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{CphA}, e *bla*_{SPM-1}, nos isolados de *Aeromonas* em estudo foi realizada pela amplificação utilizando iniciadores específicos descritos no quadro 10 empregando DNA extraído por choque térmico (CHAPMAN et al., 2001).

As condições da PCR foram as seguintes: um ciclo inicial a 95°C por 5 minutos (desnaturação), 30 ciclos de 95°C por 1 minuto (desnaturação), 50°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão); e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Em um volume final de 25µL de reação foram adicionados 5 µL de DNA, tampão10X, 200uM de DNTPs, 0,2 uM de cada iniciador e 1,25U taq-DNA-polimerase.

Para a confirmação da presença do fragmento foi utilizado de agarose 1,8% corado com brometo de etídio em eletroforese com intensidade de corrente de 6V/cm. A visualização dos fragmentos foi feita sob luz ultravioleta em equipamento fotodocumentador Epi Chemi II Darkroom e software Labworks (UVP). O peso molecular das bandas dos perfis obtidos foram estimadas por comparação com marcador de peso molecular MassRuler™ DNA Ladder 100pb (Fermentans).

Quadro 10 Iniciadores utilizados para a pesquisa dos genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{CphA}*, *bla_{SPM-1}* em isolados de *Aeromonas* de origem ambiental.

Gene	Iniciadores	Produto	Referencia
<i>bla</i> _{IMP} F	5'-GGAATAGRRTGGCTTAAYT-3'	232pb	BALSALOBRE et al. (2009a)
<i>bla</i> _{IMP} R	5'-GGTTTAAYAAARCAMCCACC-3'		
<i>bla</i> _{VIM} F	5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3'	590pb	
<i>bla</i> _{VIM} R	5'-GAGCAAKTCYAGACCGCCC-3'		
<i>bla</i> _{CphA} F	5'-TCTATTTTCGGGGCCAAGGG-3'	230pb	
<i>bla</i> _{CphA} R	5'-TCTCGGCCAGTCGCTCTTCA-3'		
<i>bla</i> _{SPM-1} F	5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3'	648pb	ZAVASCKI et al. (2005)
<i>bla</i> _{SPM-1} R	5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3'		

Os controles positivos utilizados para a pesquisa de genes de resistência foram: cepa FSP179/08 para o gene *bla_{CphA}*, cepa FCF/USP Kp-IMP para o gene *bla_{IMP}*, cepa FCF/USP Ecl 75-10433 VIM-1 para o gene *bla_{VIM}* e cepa FCF/USP PA 4811997 SPM-1, para o gene *bla_{SPM-1}* pertencentes à coleção de cultura do Laboratório Saúde Pública, do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública - USP.

3.6.2 Detecção dos genes codificadores de ESBLs: *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*

A pesquisa dos genes de resistência *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* foi realizada em DNA extraído por choque térmico, utilizando iniciadores específicos descritos no quadro 11. Para a amplificação foram utilizadas as seguintes condições de reação e ciclos: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos compostos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 52°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Em um volume final de 25µL de reação foram adicionados 5 µL de DNA, tampão10X, 200uM de DNTPs, 0,2 uM de cada iniciador e 1,25U taq-DNA-polimerase.

Para a confirmação da presença do fragmento foi utilizado gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídio em eletroforese com intensidade de corrente de 6V/cm. A visualização dos fragmentos foi feita sob luz ultravioleta em equipamento fotodocumentador Epi Chemi II Darkroom e software Labworks (UVP). O peso molecular das bandas dos perfis obtidos foram estimadas por comparação com marcador de peso molecular MassRuler™ DNA Ladder 100pb (Fermentas).

Quadro 11 Iniciadores empregados para a pesquisa dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} em isolados de *Aeromonas* de origem ambiental.

Gene	Iniciadores (5' – 3')	Produto	Referência
<i>bla</i> _{TEM} F	5'-TCGGGGAAATGTGCGCG-3'	972pb	ROJAS et al. em preparação
<i>bla</i> _{TEM} R	5'-TGCTTAATCAGTGAGGCACC-3'		
<i>bla</i> _{SHV} F	5'-TTATCTCCCTGTTAGGCACC-3'	795pb	CAO et al. (2002)
<i>bla</i> _{SHV} R	5'-GATTTGCTGATTTGCTCGG-3'		
<i>bla</i> _{CTX-M} F	5'-SCSATGTGCAGYACCAGTAA-3'	543pb	
<i>bla</i> _{CTX-M} R	5'-CCGCRATATGRTTGGTGGTG-3'		

Foram utilizados controles positivos pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Saúde Pública/FSP – USP a saber: gene *bla*_{TEM} -cepa FSP179/08, gene *bla*_{SHV} - FCF/USP KP-SHV-18 e gene *bla*_{CTX-M} - cepa FCF/USP Ec-CTX-M.

3.6.3 Detecção dos genes de AmpCs plasmidais: *bla*_{MOX-M}, *bla*_{LAT-1}, *bla*_{DHA}, *bla*_{ACC}, *bla*_{ACT} e *bla*_{FOX}

A pesquisa de genes codificadores de Carbapenemases plasmidiais foi realizado utilizando iniciadores específicos, descritos no quadro 12, para amplificação de *bla*_{MOX-M}, *bla*_{LAT-1}, *bla*_{DHA}, *bla*_{ACC}, *bla*_{ACT} e *bla*_{FOX}, empregando DNA extraído por choque térmico com as seguintes condições de reação e ciclos: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos compostos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. Em um volume final de

25µL de reação foram adicionados 5 µL de DNA, tampão10X, 200uM de DNTPs, 0,2 uM de cada iniciador e 1,25U taq-DNA-polimerase.

Para a confirmação da presença do fragmento foi utilizado gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídio em eletroforese com intensidade de corrente de 6V/cm. A visualização dos fragmentos foi feita sob luz ultravioleta em equipamento fotodocumentador Epi Chemi II Darkroom e software Labworks (UVP). O peso molecular das bandas dos perfis obtidos foram estimadas por comparação com marcador de peso molecular MassRuler™ DNA Ladder 100pb (Fermentas).

Quadro 12 Iniciadores empregados para a pesquisa dos genes codificadores de AmpC plasmidiais em isolados de *Aeromonas* de origem ambiental.

Gene	iniciadores (5' – 3')	Produto	Referencia
<i>bla</i> _{MOX-1} F	5'-GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT-3'	520pb	PÉREZ-PERÉZ e HANSON (2002)
<i>bla</i> _{MOX-1} R	5'-CACATTGACATAGGTGTGGTGC-3'		
<i>bla</i> _{LAT-1} F	5'-TGGCCAGAACTGACAGGCAAA-3'	462pb	
<i>bla</i> _{LAT-1} R	5'-TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC-3'		
<i>bla</i> _{DHA-1} F	5'-AACTTTCACAGGTGTGCTGGGTCCG-3'	405pb	
<i>bla</i> _{DHA-1} R	5'-TACGCATACTGGCTTTGC-3'		
<i>bla</i> _{ACC-1} F	5'-AACAGCCTCAGCAGCCGGTTATTC-3'	346pb	
<i>bla</i> _{ACC-1} R	5'-GCCGCAATCATCCCTAGC-3'		
<i>bla</i> _{ACT-1} F	5'-TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG-3'	302pb	
<i>bla</i> _{ACT-1} R	5'-CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT-3'		
<i>bla</i> _{FOX-1} F	5'-AACATGGGGTATCAGGGAGATGCAA-3'	190pb	
<i>bla</i> _{FOX-1} R	5'-AGCGCGTAACCGGATTGG-3'		

Para a reação da PCR do gene *bla*_{MOX}, foi utilizado o controle FSP 135/08, para o gene *bla*_{LAT-1} o controle FSP 11/10, o *bla*_{ACT} foi utilizado o controle FSP 15/10, para o gene *bla*_{DHA} o controle FSP 08/10, o gene *bla*_{ACC} o controle FSP 10/10 e por último para o gene *bla*_{FOX} o controle FSP 09/10. Todos esses controles foram fornecidos pelo Prof. Dr. Nilton Lincopan do Instituto de Ciências Biológicas (ICB).

3.6.4 Detecção dos genes de AmpCs cromossômicas: *cepH*

Foram utilizados o DNA extraído por CTAB e pesquisados o gene de resistência *cepH* por meio da PCR, utilizando iniciadores descritos no quadro 13. As condições para a realização da PCR foram: desnaturação a 95°C por 7 minutos, seguida de 30 ciclos, com desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minutos e vinte segundos e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídio em uma corrida eletroforética.

Para cada 25µL de reação foram utilizados DNA total de 250ng, taq-DNA-polimerase 1,25U, 0,2uM de cada iniciador, DNTPs 200µM, tampão10X.

Para a confirmação da presença dos fragmentos foi utilizada a eletroforese a 6V/cm em gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom e o software Labworks). Para observar as posições dos perfis de banda será utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (MassRuler™ DNA Ladder, fermentas).

Foi utilizado a cepa FSP 135/08 pertencente a cultura do Laboratório de Saúde Pública/FSP – USP como controle positivo para o gene *cepH*.

Quadro 13 Iniciadores utilizados para a pesquisa do gene *cepH* em isolados de *Aeromonas* provenientes de amostras ambientais.

Gene	Iniciador	Produto	Referência
<i>cepH</i> F	5'-ATGAAACAGACCAGAGCCCTGC-3'	520pb	BALSALOBRE et al. (2009a)
<i>cepH</i> R	5'-TTTGAGCCAGCTGGCACCTGA-3'		

3.7 DESENHO DE INICIADORES PARA A PESQUISA DE AmpC

A necessidade de desenho de iniciadores para a pesquisa de AmpC em isolados de *Aeromonas* provenientes de amostras ambientais surgiu da observação de que os iniciadores atualmente disponíveis pertencentes aos PÉREZ-PÉREZ et al. (2002) não contemplavam todas as sequências atualmente disponíveis para o grupo de antibióticos.

As sequências dos genes codificadores de AmpC disponíveis em BUSH e JACOBY (<http://www.lahey.org/Studies>) foram obtidas do banco de dado GenBank (www.ncbi.nih.gov/genbank), e alinhadas manualmente utilizando o programa Bioedit (HALL, 1999). O programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>) foi utilizado com a finalidade de selecionar as melhores regiões para serem utilizadas para o desenho dos iniciadores. A especificidade dos iniciadores foi testada com as sequências disponíveis no GenBank utilizando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (BAUER e RØRVIK, 2007).

3.8 PURIFICAÇÃO DO AMPLICON E SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO *gyrB*

O sequenciamento foi utilizado para confirmação do posicionamento taxonômico dos isolados triados pela restrição com enzimas sendo que amplicons correspondente ao gene *gyrB* dos isolados de *Aeromonas* em estudo foram sequenciados. Também foram sequenciados os amplicons correspondentes aos genes de resistência aos antibióticos para determinação da especificidade dos iniciadores utilizados e desenhados nesse estudo.

Os amplicons foram purificados utilizando Kit comercial GFX PCR DNA and gel Band Purificação Kit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Os amplicons foram enviados para sequenciamento nas duas direções utilizando os iniciadores correspondentes (Genomic Engenharia Molecular).

As seqüências resultantes foram alinhadas manualmente contra seqüências disponíveis no banco de dados GenBank (www.ncbi.nih.gov/genbank) por meio do sistema BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool). As distâncias filogenéticas para o gene *gyrB* foram computadas utilizando o método de máxima verossimilhança (TAMURA et al., 2007) e foram consideradas na forma de número de unidades de substituições utilizando o programa MEGA 4.1 Beta disponível online em <http://www.megasoftware.net/mega41.html>.

4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO

Após a triagem de centenas de isolados pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Saúde Pública, utilizando a restrição do fragmento 16S rDNA, apenas 24 isolados foram classificados em espécies diferentes de *Aeromonas hydrophila* ou *Aeromonas jandaei* como descritos no Quadro 14.

A triagem inicialmente foi realizada através da amplificação de uma região específica do gene 16S rRNA e também utilizando o iniciador Aero 16S (quadro 6) como mostram a figura 1.

Figura 1 Imagem de dois géis de agarose corado com brometo de etídio: (A) fragmento de 797 pb de uma região específica do gene 16S utilizando o iniciador Aero 16S. (B) banda de 1500 pb da amplificação dos genes 16S (a) e *gyrB* (b).

O sequenciamento do fragmento correspondente ao gene *gyrB* dos isolados confirmou o posicionamento taxonômico destes, demonstrando que dos 24 isolados do estudo: 4(16,5%) foram identificados como *A. caviae*, 5(21,0%) *A. hydrophila*, 3(12,5%) *A. aquariorum*, 1(4,0%) *A. jandaei*, 5(21,0%) *A. sanarellii* e 6(25,0%) dos isolados não foram posicionados em nenhuma das espécies previamente descritas no gênero *Aeromonas*. A figura 2 apresenta a confirmação do posicionamento

taxonômico dos isolados de *Aeromonas* utilizados nesse estudo, com base no seqüenciamento genético do fragmento do gene *gyrB*.

Entre as 4 *A. caviae* identificadas pelo sequenciamento 2(50,0%) dos isolados mantiveram a mesma identificação original da série bioquímica. Das 5 *A. hydrophila* identificada pelo seqüenciamento do gene *gyrB* apenas 1(20,0%) foi identificada como sendo *A. hydrophila* pela série bioquímica. Do mesmo modo, o único isolado de *A. jandaei* identificada pelo seqüenciamento também havia sido classificada como *A. jandaei* pela serie bioquímica, enquanto 16(66.7%) isolados que foram identificados pela série bioquímica não tiveram seus posicionamentos taxonômico confirmados pelo seqüenciamento do gene *gyrB*.

Comparando o teste fenotípico, série bioquímica, com a técnica de restrição com enzimas, dos 24 isolados somente 3 foram concordantes entre essas duas metodologias, os isolados FSP 135/08, FSP136/08 e FSP151/08. E considerando a restrição com enzimas, quando comparado com o sequenciamento do gene *gyrB* somente 3(12,5%), os isolados FSP 136/08 e FSP 393/08 e 394/08 apresentaram resultados concordantes.

Quadro 14 Classificação dos isolados de *Aeromonas* segundo a espécie inicial (identificação por série bioquímica), perfil de restrição do fragmento 16S rDNA e sequenciamento dos genes *gyrB*.

Numeração	Espécie inicial	Restrição	Gene <i>gyrB</i>
FSP 136/08	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	<i>A. caviae</i>
FSP 138/08	<i>A. veronii sobria</i>	<i>A.aquariorum</i>	<i>A.caviae</i>
FSP 147/08	<i>A.caviae</i>	<i>A.aquariorum</i>	<i>A.caviae</i>
FSP 396/08	<i>A.allsaccarophila</i>	<i>A.aquariorum</i>	<i>A.caviae</i>
FSP 151/08	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	<i>A. sanarellii</i>
FSP 186/08	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.media</i>	<i>A. sanarellii</i>
FSP 383/08	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A.aquariorum</i>	<i>A. sanarellii</i>
FSP 119/08	<i>A.caviae</i>	<i>A.aquariorum</i>	<i>A. sanarellii</i>
FSP 399/08	<i>A.caviae</i>	<i>A. trota</i>	<i>A. sanarellii</i>
FSP 135/08	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	<i>A.hydrophila</i>
FSP 154/08	<i>A.veronii sobria</i>	<i>A.caviae</i>	<i>A. hydrophila</i>
FSP 159/08	<i>A.veronii sobria</i>	<i>A.trota</i>	<i>A. hydrophila</i>
FSP 382/08	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.aquariorum</i>	<i>A. hydrophila</i>
FSP 398/08	<i>A.allosaccarophila</i>	<i>A.aquariorum</i>	<i>A. hydrophila</i>
FSP 177/08	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.caviae</i>	<i>A.aquariorum</i>
FSP 393/08	<i>A.trota</i>	<i>A.aquariorum</i>	<i>A.aquariorum</i>
FSP 394/08	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.aquariorum</i>	<i>A.aquariorum</i>
FSP 392/08	<i>A.jandaei</i>	<i>A.veronii bv sobria</i>	<i>A. jandaei</i>
FSP 74/08	<i>A. caviae</i>	<i>A.aquariorum</i>	<i>Aeromonas</i> sp.
FSP 185/08	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.media</i>	<i>Aeromonas</i> sp.
FSP 211/08	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.media</i>	<i>Aeromonas</i> sp.
FSP 251/08	<i>A.jandaei</i>	<i>A.veronii</i>	<i>Aeromonas</i> sp.
FSP 252/08	<i>A.jandaei</i>	<i>A.veronii bv sobria</i>	<i>Aeromonas</i> sp.
FSP 395/08	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.aquariorum</i>	<i>Aeromonas</i> sp.

Figura 2. Árvore filogenética das espécies do gênero *Aeromonas* utilizando o gene *gyrB*. As distâncias foram computadas utilizando o método de máxima verossimilhança (TAMURA et al., 2007) utilizando o programa MEGA 4.1 Beta disponível online em <http://www.megasoftware.net/mega41.html>. As setas indicam o posicionamento das cepas empregadas nesse estudo.

4.2 DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA

Os resultados obtidos para a presença de genes de virulência nos diferentes isolados de *Aeromonas* estudados estão apresentados no quadro 15. De acordo com os resultados deste estudo foi observada maior frequência e variedade de genes de virulência *act*, *alt* e *ast* em cepas de *Aeromonas* originadas de amostras provenientes de esgoto do que de água de rio, ou de lagoa.

De modo geral, dentre os isolados estudados, foi obtido o seguinte resultado de acordo com o posicionamento taxonômico: dentre os 4 isolados classificados como *A. caviae*, 1(25,0%) não apresentou resultado positivo para os genes de virulência pesquisados, 3(75,0%) apresentaram positividade para o gene *ast*, 2(50,0%) apresentaram positividade para o gene *alt*, 2(50,0%) apresentaram resultado positivo para os genes *alt* e *ast*, e 1(25,0%) apresentou resultado positivo para o gene *act*. 1(25%) foi observada positividade concomitante para os três genes de virulência pesquisados (*act*, *alt* e *ast*) nessa espécie de *Aeromonas*.

Dos isolados posicionados como *A. hydrophila*, 3(60%) não foi observado positividade para nenhum dos três genes de virulência pesquisados (*act*, *alt* e *ast*), 1(20,0%) apresentou positividade para os genes *act* e *alt*, 1(20,0%) apresentaram positividade somente para gene *act*.

Entre os isolados de *A. aquariorum*, 1(33,3%) apresentou positividade para os genes *act* e *ast*, e 2(66,7%) não apresentaram positividade para os genes de virulência em estudo.

O isolado identificado como *A. jandaei* não apresentou positividade para nenhum dos genes de virulência empregados nesse estudo (quadro15). E os isolados que não tiveram os seus posicionamento taxonômico confirmado pelo gene *gyrB* apresentou um exemplar com o gene *alt*.

Entre os isolado da *A. sanarellii* 1(20,0%) possuía os genes *alt* e *ast* e 1(20,0%) apresentou somente o gene *act*, 1(20%) somente o gene *alt*, 1(20%) somente o gene *ast*, e 1(20%) não possuía nenhum dos genes estudos.

Quadro 15 Genes de virulência em isolados de *Aeromonas* provenientes de diferentes ambientes aquáticos.

Identificação	Local do isolamento	Espécie	Virulência		
			<i>act</i>	<i>alt</i>	<i>ast</i>
FSP 136/08	Esgoto	<i>A. caviae</i>	-	-	+
FSP 138/08	Esgoto	<i>A. caviae</i>	+	+	+
FSP 147/08	Esgoto	<i>A. caviae</i>	-	+	+
FSP 396/08	Rio	<i>A. caviae</i>	-	-	-
FSP 151/08	Esgoto	<i>A. sanarellii</i>	-	+	-
FSP 186/08	Rio	<i>A. sanarellii</i>	+	-	-
FSP 383/08	Rio	<i>A. sanarellii</i>	-	-	+
FSP 119/08	Esgoto	<i>A. sanarellii</i>	-	+	+
FSP 399/08	Esgoto	<i>A. sanarellii</i>	-	-	-
FSP 135/08	Esgoto	<i>A. hydrophila</i>	+	+	-
FSP 154/08	Esgoto	<i>A. hydrophila</i>	+	-	-
FSP 159/08	Esgoto	<i>A. hydrophila</i>	-	-	-
FSP 382/08	Rio	<i>A. hydrophila</i>	-	-	-
FSP 398/08	Rio	<i>A. hydrophila</i>	-	-	-
FSP 177/08	Esgoto	<i>A. aquariorum</i>	+	-	+
FSP 393/08	Lagoa	<i>A. aquariorum</i>	-	-	-
FSP 394/08	Lagoa	<i>A. aquariorum</i>	-	-	-
FSP 392/08	Lagoa	<i>A. jandaei</i>	-	-	-
FSP 252/08	Reservatório	<i>Aeromonas</i> sp	-	-	-
FSP 74/08	Esgoto	<i>Aeromonas</i> sp	-	-	-
FSP 185/08	Rio	<i>Aeromonas</i> sp	-	-	-
FSP 211/08	Reservatório	<i>Aeromonas</i> sp	-	+	-
FSP 251/08	Reservatório	<i>Aeromonas</i> sp	-	-	-
FSP 395/08	Rio	<i>Aeromonas</i> sp	-	-	-

4.3 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

Os resultados do teste fenotípico para detecção de resistência aos antibióticos, a grande maioria dos isolados mostrou ser resistente à pelo menos um dos antibióticos utilizados (quadro 16). A detecção fenotípica de resistência aos antibióticos foi observada independente do tipo de ambiente de origem dos isolados, impactado como o esgoto ou ambiente com menor impacto.

O perfil de suscetibilidade aos antibióticos demonstrou que 12(50,0%) dos isolados foram resistentes a pelo menos um antibiótico carbapenêmicos; 1(4,2%) dos isolados foi resistente a Sufazotrim, 11(45,8%) resistentes à tetraciclina, 3(12,5%) resistentes e 2(8,3%) intermediários ao cloranfenicol; 2(8,4%) e 4(16,6%) dos isolados foram resistentes e intermediários à estreptomicina respectivamente; 3(12,5%) dos isolados apresentaram resultado intermediário para o ácido nalídixico, porém nenhum dos isolados apresentou resistência aos antibióticos aztreonam, ácido nalídixico, cefepime e ciprofloxacilina. Quanto ao antibiótico aztreonam, foi observado resultado intermediário em 1(4,2%) dos isolados. Do total de organismos estudados, 1(4,2%) foram resistentes à gentamicina, e 4(16,7%) foram intermediários a esse antibiótico. Todos os isolados identificados no estudo foram resistentes à ampicilina.

Na figura 3 são apresentados alguns dos testes de sensibilidade e pesquisa de produção de enzimas para os microrganismos em estudo.

Quadro 16 Teste fenotípica de resistência a antibióticos em isolados de *Aeromonas* provenientes de diferentes fontes ambientais.

Numeração	Espécies	Antibiograma (mm)																	
		CTT	FOX	CPD	CTX	CAZ	IMP	MER	ETP	AMP	SUT	TET	CLO	EST	ATM	GEN	CPM	CIP	NAL
FSP 136/08	<i>A. caviae</i>	(22)S	(14)R	(10)R	(38)S	(34)S	(34)S	(32)S	(14)R	(0)R	(36)S	(0)R	(36)S	(22)S	(34)S	(20)S	(36)S	(40)S	(40)S
FSP 138/08	<i>A. caviae</i>	(0)R	(0)R	(0)R	(22)I	(22)S	(34)S	(34)S	(10)R	(0)R	(30)S	(0)R	(36)S	(18)S	(26)S	(20)S	(24)S	(36)S	(38)S
FSP 147/08	<i>A. caviae</i>	(28)S	(22)S	(14)R	(34)S	(34)S	(34)S	(38)S	(14)R	(0)R	(30)S	(0)R	(36)S	(24)S	(40)S	(22)S	(42)S	(36)S	(42)S
FSP 396/08	<i>A. caviae</i>	(8)R	(0)R	(8)R	(22)S	(22)S	(26)S	(30)S	(30)S	(0)R	(34)S	(28)S	(36)S	(22)S	(42)S	(22)S	(42)S	(38)S	(42)S
FSP 151/08	<i>A. sanarellii</i>	(8)R	(0)R	(0)R	(14)R	(18)S	(30)S	(32)S	(22)S	(0)R	(24)S	(22)S	(38)S	(24)S	(42)S	(24)S	(40)S	(34)S	(14)I
FSP 186/08	<i>A. sanarellii</i>	(0)R	(8)R	38(S)	36(S)	36(S)	(28)S	(28)S	(32)S	(0)R	(30)S	(0)R	(14)I	(18)S	(32)S	(14)I	(30)S	(24)S	(16)I
FSP 383/08	<i>A. sanarellii</i>	(0)R	(0)R	(0)R	(12)R	(0)R	(0)R	(12)R	(0)R	(0)R	(30)S	(0)R	(0)R	(14)I	(20)I	(14)I	(24)S	(40)S	(36)S
FSP 119/08	<i>A. sanarellii</i>	(34)S	(6)R	(14)R	(42)S	(42)S	(34)S	(38)S	(36)S	(0)R	(30)S	(28)S	(34)S	(22)S	(42)S	(20)S	(42)S	(42)S	(42)S
FSP 399/08	<i>A. sanarellii</i>	(26)S	(10)R	(14)R	(38)S	(34)S	(34)S	(32)S	(20)S	(0)R	(30)S	(24)S	(32)S	(16)I	(32)S	(16)I	(36)S	(34)S	(34)S
FSP 135/08	<i>A. hydrophila</i>	(8)R	(16)I	(0)R	(10)R	(22)S	(0)R	(26)S	(0)R	(0)R	(22)S	(22)S	(36)S	(18)S	(30)S	(24)S	(22)S	(36)S	(36)S
FSP 154/08	<i>A. hydrophila</i>	(24)S	(8)R	(0)R	(22)I	(32)S	(6)R	(8)R	(26)S	(0)R	(30)S	(26)S	(36)S	(24)S	(42)S	(28)S	(40)S	(42)S	(36)S
FSP 159/08	<i>A. hydrophila</i>	(26)S	(10)R	(14)R	(38)S	(34)S	(34)S	(32)S	(20)S	(0)R	(30)S	(24)S	(32)S	(16)I	(32)S	(18)S	(36)S	(34)S	(34)S
FSP 382/08	<i>A. hydrophila</i>	(0)R	(12)R	(0)R	(42)S	(34)S	(8)R	(32)S	(24)S	(0)R	(28)S	(24)S	(36)S	(22)S	(42)S	(20)S	(38)S	(42)S	(36)S
FSP 398/08	<i>A. hydrophila</i>	(8)R	(6)R	(6)R	(8)R	(26)S	(30)S	(38)S	(24)S	(0)R	(10)R	(0)R	(26)S	(0)R	(34)S	(12)R	(32)S	(36)S	(14)I
FSP 177/08	<i>A. aquariorum</i>	(24)S	(20)S	(28)S	(36)S	(30)S	(42)S	(38)S	(26)S	(0)R	(36)S	(36)S	(40)S	(18)S	(42)S	(24)S	(40)S	(42)S	(42)S
FSP 393/08	<i>A. aquariorum</i>	(26)S	(0)R	(10)R	(0)R	(8)R	(10)R	(26)S	(0)R	(0)R	(26)S	(0)R	(16)I	(22)S	(22)S	(20)S	(32)S	(32)S	(32)S
FSP 394/08	<i>A. aquariorum</i>	(0)R	(0)R	(0)R	(0)R	(0)R	(8)R	(20)S	(14)R	(0)R	(26)S	(0)R	(0)R	(22)S	(42)S	(20)S	(36)S	(36)S	(30)S
FSP 392/08	<i>A. jandaei</i>	(40)S	(34)S	(36)S	(42)S	(42)S	(16)S	(28)S	(18)I	(0)R	(32)S	(0)R	(36)S	(18)S	(42)S	(18)S	(36)S	(42)S	(36)S
FSP 74/08	<i>Aeromonas</i> sp	(42)S	(36)S	(34)S	(42)S	(42)S	(26)S	(26)S	(22)S	(0)R	(30)S	(30)S	(42)S	(22)S	(42)S	(20)S	(42)S	(42)S	(42)S
FSP 185/08	<i>Aeromonas</i> sp	(24)S	(12)I	(6)R	(6)R	(14)R	(28)S	(28)S	(18)I	(0)R	(30)S	(30)S	(34)S	(12)I	(36)S	(14)I	(34)S	(42)S	(42)S
FSP 211/08	<i>Aeromonas</i> sp	(24)S	(0)R	(6)R	(6)R	(14)R	(30)S	(30)S	(22)S	(0)R	(30)S	(10)R	(30)S	(8)R	(42)S	(22)S	(38)S	(42)S	(36)S
FSP 251/08	<i>Aeromonas</i> sp	(36)S	(36)S	(16)R	(36)S	(36)S	(24)S	(24)S	(0)R	(0)R	(40)S	(34)S	(36)S	(18)S	(34)S	(24)S	(42)S	(36)S	(36)S
FSP 252/08	<i>Aeromonas</i> sp	(22)S	(26)S	(32)S	(36)S	(30)S	(20)S	(22)S	(0)R	(0)R	(34)S	(34)S	(36)S	(16)S	(42)S	(24)S	(36)S	(42)S	(36)S
FSP 395/08	<i>Aeromonas</i> sp	(0)R	(0)R	(0)R	(12)R	(0)R	(8)R	(12)R	(0)R	(0)R	(28)S	(0)R	(0)R	(24)S	(34)S	(24)S	(34)S	(40)S	(34)S

Cefotetan (CTT); cefoxitina (FOX); cefpodoxima (CPD); cefotaxima (CTX); cefadizima (CAZ); imipenem (IMP); meropenem (MER); ertapenem (ETP); ampicilina (AMP); Sufazotrim (SUT); tetraciclina (TET); cloranfenicol (CLO); estreptomicina (EST); aztreonam (ATM); gentamicina (GEN); cefepime (CPM); ciprofloxacilina (CIP); ácido nalidixico (NAL).

Figura 3. **A** - Detecção de resistência aos antibióticos em *Aeromonas*: cefotetan (CTT), foxitina (FOX), cefotaxima (CTX), cefpodoxima (CPD), ceftazidima (CAZ), imipenem (IMP), meropenem (MER); **B** - detecção fenotípica da produção de ESBL usando o método de sinergismo: cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) e cefpodoxima (CPD), em uma placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton + cloxacilina e no centro um disco de amoxicilina + ácido clavulânico; **C** - Detecção fenotípica de metalo-β-lactamase utilizando a técnica de disco combinado: imipenem (IMP), meropenem (MER) e ertapenem (ETP) e cada um desses antibióticos com o inibidor EDTA; **D** e **E** - Detecção fenotípica da produção de AmpC utilizando a técnica de discos combinados. **D** cefoxitina (FOX) e cefoxitina com ácido fenilborônico (BA), **E** (cefotetan) (CTT) e (CTT + BA).

A partir dos resultados de disco difusão, foram realizados os testes fenotípicos para detecção de produção das enzimas β-lactamases de espectro estendido - ESBL, metalo-β-lactamases - MBL, e cefalosporinasas - AmpC. Os resultados demonstraram que 3(100%) e 3(100%) dos isolados identificados como *A. aquariorum* foram sugestivas de produzirem MBL e AmpC respectivamente; para *A. caviae* 1(25,0%) e 4(100%) demonstraram positividade para MBL e AmpC

respectivamente; para *A. hydrophila* 3(60,0%) foram sugestivos de produzirem MBL e 5(100%) AmpC. Para o isolado de *A. jandaei* não foi observada resistência para nenhum antibiótico que pudesse sugerir a produção de MBL ou AmpC. As 06 *A. sanarellii* obtidas no estudo, apresentaram 6(100%) positividade para a produção de AmpC e 1(16,7%) apresentou positividade para a produção de MBL. Dos 6 isolados de *Aeromonas* com posicionamento taxonômico inconclusivo, 4(66,7%) e 3(50,0%) foram positivas para a produção das enzimas MBL e AmpC respectivamente. Nenhum isolado apresentou resultado positivo, no teste fenotípico, para a produção de ESBL (quadro 17).

Quadro 17 Teste fenotípico de produção de enzimas ESBL, MBL e AmpC pelas *Aeromonas* identificadas nesse estudo.

Numeração	Identificação	ESBL	MBL	AmpC
FSP 136/08	<i>A. caviae</i>	-	+	+
FSP 138/08	<i>A. caviae</i>	-	-	+
FSP 147/08	<i>A. caviae</i>	-	NR	+
FSP 396/08	<i>A. caviae</i>	-	NR	+
FSP 151/08	<i>A. sanarellii</i>	-	NR	+
FSP 186/08	<i>A. sanarellii</i>	NR	NR	+
FSP 383/08	<i>A. sanarellii</i>	-	-	+
FSP 119/08	<i>A. sanarellii</i>	NR	NR	+
FSP 399/08	<i>A. sanarellii</i>	-	NR	+
FSP 135/08	<i>A. hydrophila</i>	-	+	+
FSP 154/08	<i>A. hydrophila</i>	-	+	+
FSP 159/08	<i>A. hydrophila</i>	-	NR	+
FSP 382/08	<i>A. hydrophila</i>	-	+	+
FSP 398/08	<i>A. hydrophila</i>	-	NR	+
FSP 177/08	<i>A. aquariorum</i>	NR	NR	NR
FSP 393/08	<i>A. aquariorum</i>	-	+	+
FSP 394/08	<i>A. aquariorum</i>	-	+	+
FSP 392/08	<i>A. jandaei</i>	NR	NR	NR
FSP 74/08	<i>Aeromonas</i> sp	NR	NR	NR
FSP 185/08	<i>Aeromonas</i> sp	-	+	+
FSP 211/08	<i>Aeromonas</i> sp	-	NR	+
FSP 251/08	<i>Aeromonas</i> sp	-	+	NR
FSP 252/08	<i>Aeromonas</i> sp	NR	+	NR
FSP 395/08	<i>Aeromonas</i> sp	-	+	+

NR- não realizado devido às características observadas no antibiograma;

(-) negativos; (+) positivos

4.4 DETECÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

4.4.1. Desenho de iniciadores para detecção do grupo AmpC:

Para realizar a pesquisa de genes de resistência do grupo das AmpCs em isolados de *Aeromonas* provenientes de amostras ambientais foram utilizados os DNAs extraídos por choque térmico e assim realizada a PCR dos genes de resistência *bla*_{MOX}, *bla*_{LAT-1}, *bla*_{DHA}, *bla*_{ACC}, *bla*_{ACT} e *bla*_{FOX}, utilizando iniciadores descritos no Quadro 18.

A reação da PCR consistiu de: desnaturação inicial a 95°C por 7 minutos, seguida de 30 ciclos, com desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Para cada 25µL de reação foram utilizados DNA total 25µL, taq-DNA-polimerase 1,25U, 0,2 uM de cada iniciador, DNTPs 200µM, tampão 10X.

Para a confirmação da presença dos fragmentos foi utilizada a eletroforese a 6V/cm em gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom e o software Labworks). E para observar as posições dos perfis de banda foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (MassRuler™ DNA Ladder, fermentas).

Para a reação da PCR dos genes *bla*_{MOX}, *bla*_{CMY}, *bla*_{CepH} e o *bla*_{cepS}, foram utilizados o controle FSP 135/08, para os genes *bla*_{CMY}, *bla*_{LAT-1} o controle FSP 11/10, para o gene *bla*_{MIR} o controle FSP 15/10, para os genes *bla*_{EBC} e o *bla*_{ACT} foi utilizado o controle FSP 15/10, para o gene *bla*_{DHA} o controle FSP 08/10, o gene *bla*_{ACC} o controle FSP 10/10 e por último para o gene *bla*_{FOX} o controle FSP 09/10. Todos esses controles foram fornecidos pelo Instituto de Ciências Biológicas (ICB), pelo Prof. Dr. Nilton Lincopan.

Com a realização da PCR com os iniciadores desenhados nesse trabalho foi detectada positividade para o gene tipo *bla*_{MOX} em 5(20,8%) dos isolados de *Aeromonas* estudados: 2 amostras de *A. caviae*, 1 *A. sanarellii* e 2 *Aeromonas* spp.

Dos isolados analisados 20(83,3%) foram positivos para a presença do gene *cphA*. O gene *bla*_{TEM}, codificador da enzima conhecida como ESBL foi detectado em 17(70,8%) isolados. Em relação aos demais genes de resistência aos antibióticos

estudados não foram observados positividade nem nos iniciadores propostos por PÉREZ-PÉREZ et al. (2002), nem pelos iniciadores propostos no presente estudo.

O gene *cepH* foi detectado em 02 das *A. hydrophila* e em nenhuma das outras espécies estudadas.

Quadro 18 Iniciadores empregados para a pesquisa dos genes AmpCs para os isolados de *Aeromonas* provenientes de amostras ambientais.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Produto	Referência
<i>bla</i> _{MOX} / <i>bla</i> _{CMY} / <i>bla</i> _{CepH} / <i>bla</i> _{cepS} F (*) <i>bla</i> _{MOX} / <i>bla</i> _{CMY} / <i>bla</i> _{CepH} / <i>bla</i> _{cepS} R	AGCACAGGATCCCGGGCA CATGACGAYGCCGATCC	947 pb	Esse estudo
<i>bla</i> _{CMY} / <i>bla</i> _{LAT-1} F (**) <i>bla</i> _{CMY} / <i>bla</i> _{LAT-1} R	ATGATGAAAAAATCGTTATGC GCTTTTCAAGAATGCGCCA	1149pb	
<i>bla</i> _{MIR} F <i>bla</i> _{MIR} R	TAAGCTGTGCCCTGCTGC CCGCCTCAACGCGTGC	1106pb	
<i>bla</i> _{EBC} / <i>bla</i> _{ACT} F <i>bla</i> _{EBC} / <i>bla</i> _{ACT} R	TTTGCTGCGCCCTGCTGC CCGCCTCAACGCGTGC	1106pb	
<i>bla</i> _{DHA} F <i>bla</i> _{DHA} R	ATGGCGGTTGCCGTCTCC CCAGCGGTGCCAGGATCC	568pb	
<i>bla</i> _{ACC} F <i>bla</i> _{ACC} R	ATGCGTAAAAAATGCAGA ATGCCATGCTGGCACAGG	1270pb	
<i>bla</i> _{FOX} F <i>bla</i> _{FOX} R	GCTGGGTAGCCTGCTG TCACTCGGCCAACTGACTC	1119pb	

(*) *bla*_{MOX-1}, *bla*_{MOX-2}, *bla*_{MOX-3}, *bla*_{MOX-4}, *bla*_{MOX-5}, *bla*_{MOX-6}, *bla*_{MOX-7}, *bla*_{CMY-1b}, *bla*_{CMY-8}, *bla*_{CMY-8b}, *bla*_{CMY-10}, *bla*_{CMY-11}, *bla*_{CMY-19}.

(**) *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CMY-2a}, *bla*_{CMY-4}, *bla*_{CMY-6}, *bla*_{CMY-7}, *bla*_{CMY-12}, *bla*_{CMY-13}, *bla*_{CMY-14}, *bla*_{CMY-15}, *bla*_{CMY-16}, *bla*_{CMY-18}, *bla*_{CMY-21}, *bla*_{CMY-22}, *bla*_{CMY-23}, *bla*_{CMY-24}, *bla*_{CMY-25}, *bla*_{CMY-26}, *bla*_{CMY-27}, *bla*_{CMY-28}, *bla*_{CMY-29}, *bla*_{CMY-30}, *bla*_{CMY-31}, *bla*_{CMY-32}, *bla*_{CMY-33}, *bla*_{CMY-34}, *bla*_{CMY-35}, *bla*_{CMY-36}, *bla*_{CMY-37}, *bla*_{CMY-39}, *bla*_{CMY-40}, *bla*_{CMY-43}, *bla*_{CMY-44}, *bla*_{CMY-45}, *bla*_{LAT-1}.

Quadro 19 Pesquisa de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Aeromonas* provenientes de amostras ambientais.

Identificação	MBL				ESBL			AmpC						
	<i>bla</i> _{CphA}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{SPM}	<i>bla</i> _{CTX}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>cepH</i>	<i>bla</i> _{MOX-M}	<i>bla</i> _{FOX}	<i>bla</i> _{CIT}	<i>bla</i> _{DHA}	<i>bla</i> _{ACC}	<i>bla</i> _{EBC}
FSP 136/08	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FSP 138/08	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FSP 147/08	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
FSP 396/08	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
FSP 151/08	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FSP 186/08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FSP 383/08	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FSP 119/08	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
FSP 399/08	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FSP 135/08	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
FSP 154/08	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FSP 159/08	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FSP 382/08	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
FSP 398/08	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FSP 177/08	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FSP 393/08	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FSP 394/08	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FSP 392/08	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FSP 74/08	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FSP 185/08	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
FSP 211/08	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
FSP 251/08	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FSP 252/08	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FSP 395/08	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

5. DISCUSSÃO

A distribuição e diversidade de organismos do gênero *Aeromonas*, no ambientes aquático e sua relação com casos de doença em humanos tem despertado o interesse de pesquisadores no mundo todo (FALCÃO et al., 1998; CAVALLO et al., 1999; IVANOVA et al., 2001; PIANETTI et al., 2004). Esse interesse está relacionado à sua capacidade de adaptação e à capacidade de multiplicar-se na ausência de um hospedeiro humano, o que lhe confere a característica de ser um organismo autóctone no ambiente (BAHLAOUÏ et al., 1997; IMZILN et al., 1998; SINGH et al., 1992; BENCHOKROUN et al., 2003).

Outra característica das espécies do gênero *Aeromonas* é sua grande variabilidade fenotípica o que dificulta o posicionamento taxonômico desses organismos utilizando apenas testes bioquímicos. Atualmente, é necessário lançar mão de métodos moleculares para determinar com exatidão a espécie de *Aeromonas* que se deseja descrever. E como esses métodos raramente são utilizados na rotina laboratorial, a real distribuição das diferentes espécies de *Aeromonas* é desconhecida (JOSEPH e CARNAHAN 2000, ABBOTT et al., 2003).

A partir da utilização da biologia molecular houve grande interesse da comunidade científica em reavaliar organismos que haviam sido classificados com base em testes fenotípicos, e como resultado, muitos microrganismos foram reclassificados, mudando de grupos taxonômicos (COLWELL et al., 1986 e IVANOVA et al., 2001), e assim uma variedade de novas espécies foram descritas e sendo incluídas no gênero *Aeromonas* como os organismos descritos por HARF-MONTEIL et al. (2004), MIÑANA-GALBIS et al. (2004), DEMARTA et al. (2008), MARTÍNEZ-MURCIA et al. (2009), ALPERI et al. (2009) e ALPERI et al. (2010).

5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

No presente estudo, os métodos moleculares foram utilizados para confirmação do posicionamento taxonômico dos isolados previamente identificados através de métodos fenotípicos – série bioquímica. A evidenciação de divergência nos resultados obtidos pelos métodos de restrição do fragmento 16S rDNA e sequenciamento da região conservada do genoma, gene *gyrB*, corrobora com os relatos da literatura científica para o gênero *Aeromonas* (YÁÑEZ et al., 2003) (figura 3).

A triagem dos isolados utilizando a restrição com enzimas, favoreceu em grande parte a busca pelas espécies de interesse, pois separou aquelas que tinham características muito diferentes de *A. hydrophila* e *A. jandaei* logo na primeira enzima utilizada (*pstI*) e o sequenciamento só foi realizado para aqueles isolados com potencial de pertencerem ao grupo de espécies de interesse para o estudo.

A confirmação de 05 isolados caracterizados como *A. hydrophila* e 01 como *A. jandaei*, quando empregado, o sequenciamento do gene 16S rDNA, demonstra a presença de deleções no sítio de restrição dessas espécies e, portanto esses isolados foram triados como pertencentes ao grupo sem o sítio de corte da enzima *Pst I* – ou seja, onde se encaixam *A. caviae*, *A. veronii*, *A. molluscorum*, *A. simiae*, *A. eucrenophila*, *A. schubertii*, *A. encheleia*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. allosaccarophila* e *A. bivalvium*. Esse fato foi anteriormente observado em estudos realizados por ALPERI et al. (2008) que demonstraram que essa metodologia poderia gerar incorreções na identificação das espécies do gênero *Aeromonas* utilizando restrição desse fragmento.

Embora não fosse objetivo do estudo comparar os métodos de identificação empregados. O sequenciamento do gene *gyrB* foi o que se mostrou mais efetivo na diferenciação das espécies do gênero *Aeromonas* muito provavelmente pelo maior número de diferenças que apresenta essa região – de 57 a 60 nucleotídeos (YÁÑEZ et al., 2003).

A metodologia aplicada para identificação dos isolados de *Aeromonas* utilizada nesse estudo, permitiu, além da identificação de espécies já descritas para o

gênero, identificar um grupo de isolados que ficou posicionado num agrupamento separado sugerindo que esses organismos possam pertencer a uma nova espécie do gênero *Aeromonas* (figura 2). Estudo recente demonstrou que *Aeromonas aquariorum*, que foi inicialmente isolada de peixes ornamentais em aquários, era a mesma de um grupo de isolados obtidos de amostras provenientes de humanos, revelando a emergência da espécie que passou a ser descrita como patógeno humano (FIGUEIRAS et al., 2009).

A importância da correta identificação de organismos em nível de espécie, tanto no ambiente quanto na área clínica, possibilita a elucidação de casos e de elos epidemiológicos em que o ambiente - água, animais ou alimentos – podem representar fontes de contaminação por agentes patogênicos.

5.2 VIRULÊNCIA

De acordo com os resultados do quadro 15 as espécies de ambientes menos poluídos como os dos rios, lagoas e represas, apresentaram menor número de genes de virulência, no máximo um gene, e em esgoto foram observados isolados com até três genes, sendo que um isolado não apresentou nenhum gene. Os resultados sugerem que genes de virulência sejam mais freqüentes em isolados de *Aeromonas* provenientes de ambientes mais eutrofizados do que em ambientes menos eutrofizados.

O esgoto doméstico pode representar a diversidade de organismos presentes nas fezes da população da região em estudo, porém no caso do gênero *Aeromonas*, mesmo sabendo que esses organismos são ubiqüitários do ambiente aquático, e que *Aeromonas caviae* é a espécie de *Aeromonas* mais freqüentemente isolada de ambientes com alto grau de poluição (MARTONE-ROCHA et al., 2009), não existem dados no Brasil sobre doenças causadas por espécies do gênero *Aeromonas*, não nos permitindo relacionar os resultados obtidos com a presença de casos na população. Alguns estudos como o de KOZINSKA (2007) sugerem que algumas espécies de *Aeromonas* sintetizam mais fatores de virulência e com mais freqüência

que outras. Este fenômeno sugere que a virulência nesse gênero pode ser de origem clonal e que somente alguns clones podem ser responsáveis pela progressão da doença (SZCZUKA e KAZNOWSKI, 2004; AGUILERA-ARREOLA et al., 2007).

Por outra perspectiva, os resultados deste estudo sugerem que a presença desses genes pode favorecer a sobrevivência do organismo por períodos mais prolongados em ambientes que possuem elevadas taxas de poluentes e matéria orgânica (GRANUM et al., 1998). Os resultados referentes aos isolados provenientes de ambientes menos impactados demonstraram a baixa frequência desses genes, e podem refletir a necessidade de manutenção de reservas energéticas para o crescimento e propagação da espécie em ambientes com poucos nutrientes, e conseqüentemente influenciam na manutenção dos seus genes de virulência (BRANDI et al., 1999).

Nesse estudo foram obtidos 4 isolados com 2 genes de virulência e 1 isolado com os três genes de virulência e de acordo com HEUZENROEDER et al. (1999) a presença de dois genes de toxinas hemolíticas em *Aeromonas* pode contribuir com a diarreia, independentemente do local onde estes microrganismos foram coletados, e também algumas espécies de *Aeromonas* produzem β -hemolisina que é responsável por acúmulo de maior volume de fluido, podendo provocar uma reação mais danosa para o hospedeiro. E este mesmo estudo descreve a β -hemolisina produzida por *A. caviae* como sendo controlada por fatores ambientais (WANG et al., 1996).

Os genes de virulência já foram detectados em *A. hydrophila* e *A. jandaei* em amostras ambientais (BALSALOBRE et al., 2009b). Do mesmo modo, o presente estudo detectou *A. hydrophila* com esses genes de virulência, no entanto, *A. jandaei* não apresentou nenhuma positividade para os referidos genes. No estudo desenvolvido por FIQUEIRAS et al. (2009) os autores detectaram os genes de virulência *act*, *alt* e *ast* em *A. aquariorum* isolados de pacientes, no presente trabalho foi identificada um isolado com dois genes o *act* e o *ast* em *A. aquariorum* do meio aquático.

É importante o estudo da virulência em organismos do gênero *Aeromonas*, pois essas bactérias já foram relacionados a um surto em 2004 em São Bento do Urna, Pernambuco em 114 casos de diarreia (HOFER et al., 2006).

De acordo com KIROV et al. (2000) existem dificuldades na detecção de cepas de *Aeromonas* potencialmente significativas para saúde pública em alimentos e na água, como também o conhecimento das incidência, das propriedades de virulência, ou ainda se esses isolados podem colonizar ou produzir toxinas. De acordo com o esses autores foi detectado um grande número de *Aeromonas* em alimentos que devem ser considerado como uma ameaça potencial para a saúde dos indivíduos imunocomprometidos.

5.3 RESISTÊNCIA

O gênero *Aeromonas* inicialmente foi descrito como suscetível aos antibióticos dos tipos tetraciclina, cloranfenicol, cefalosporina, aminoglicosídeo e fluoroquinolonas (KO et al., 1998).

No entanto, sabe-se que essas bactérias têm a capacidade de adquirir resistência durante o tratamento (KO et al., 1998) como, por exemplo, à tetraciclina que é um antibiótico usado comumente para o tratamento de infecções bacterianas em peixes (AGERSO et al., 2007).

Nos resultados do teste do perfil de resistência aos antibióticos quase todos os isolados se mostraram resistentes a pelo menos um ou mais antibióticos, esse resultado pode representar um problema para a saúde pública, uma vez que essa resistência pode ser transportada por elementos móveis como plasmídeos e transposons a outras bactérias reconhecidamente patogênicas (quadro 16 e 19) (RAHMAN et al., 2009).

A contaminação por antibióticos na água contribui com a manutenção e disseminação dos genes de resistência a antibióticos, permitindo a perpetuação desses genes tanto em ambiente mais limpo como nos mais poluídos (HUDDLESTON et al., 2006). A resistência aos antibióticos foi observada nos resultados desse estudo, ocorrendo tanto num ambiente extrememente impactado (esgoto), como também em um ambiente menos impactado (lagoa).

A cefoxitina e os carbapenêmicos (imipenem, meropenem) constituem os mais potentes antibióticos indutores de resistência. As cefalosporinas da terceira geração, como também o ácido clavulânico mostram-se indutores menos potentes na

prática-clínica, enquanto a indução de resistência pelo aztreonam, pelo sulbactam e tazobactam e pelas cefalosporinas de quarta geração é mínima. Esta observação feita por TAVARES (2001), foi também obtida no presente estudo.

A identificação dos genes codificadores de β -lactamases responsáveis pela resistência fenotípica aos β -lactâmicos foi inicialmente limitada porque as espécies de *Aeromonas* analisadas nesse trabalho são pouco estudadas. E conseqüentemente, não é possível concluir se as espécies estudadas não possuíam, realmente, os genes, ou se sua resistência é conseqüência de alteração da porina, ou da bomba de efluxo, ou por algum outro mecanismo ainda não descrito para o gênero *Aeromonas*. Ou ainda, se estes microrganismos possuem os genes, mas os iniciadores descritos na literatura não são capazes de amplificá-los (HEUZENROEDER et al., 1999).

Como consequência da afirmação de HEUZENROEDER et al. (1999) foram desenhados novos iniciadores para a detecção dos genes de *ampCs*. Com esses novos iniciadores foi possível a amplificar de 5 genes tipo *bla_{MOX}*.

KO et al. (1998), NIUMSUP et al. (2003) e BALSALOBRE et al. (2009a) relataram que é possível ocorrer múltipla-resistência e que as *Aeromonas* podem ser resistente pela presença de genes cromossômicos tanto às cefalosporinas como aos carbapenêmicos. Esta afirmação foi confirmada no presente estudo, no qual foram detectados 2 genes *cepH* e 21 gene *cphA* que são genes cromossômicos e são capazes de proporcionar às bactérias, resistências às cefalosporinas e aos carbapenêmicos respectivamente.

5.3.1 Tetraciclina

As tetraciclina são antibióticos bacteriostáticos de amplo espectro que atuam por inibição da síntese de proteínas. A união reversível se produz na subunidade ribossômica 30S dos microrganismos sensíveis. Não inibem a síntese da parede celular bacteriana.

Autores como AKINBOWALE et al. (2007) acreditam que exista relação entre a quantidade de antibióticos utilizados na produção de animais para o consumo humano e da aquicultura com o aumento da resistência aos antibióticos utilizados pela área clínica. E como se sabe as *Aeromonas* são bactérias ubiqüitárias nos

ambientes aquáticos, podem ser isoladas do leite, das verduras, de peixes e outros animais. Como essas bactérias estão no ambiente, essas podem contaminar o homem através da ingestão de alimento contaminado (BALASSIANO et al., 2007).

JACOBS e CHENIA (2007) detectaram alta prevalência de resistência a tetraciclina em *Aeromonas*, sendo esse resultado semelhante aos obtidos no presente estudo no qual das 24 cepas estudadas 11(44,0%) foram resistentes à tetraciclina (quadro 16) que é uma droga de amplo espectro e que está sendo muito utilizada na veterinária, na agricultura e na área clínica. Já foram descritos mecanismos que contribuem com a resistência a este antimicrobiano e um destes mecanismos é codificado por genes da família *tet*, que podem ser mobilizados por plasmídios, transposons ou integrons (TENDENCIA & DELA PEÑA, 2001 e BALASSIANO et al., 2007).

Estudos indicam que esses genes *tet* podem codificar o mecanismo de bomba de efluxo. Outras ações possíveis desses genes é a proteção ribossomal ou ainda a inativação dos antibióticos (TENDENCIA & DELA PEÑA, 2001 e BALASSIANO et al., 2007). No entanto, não podemos concluir qual foi o meio de resistência utilizado pelos isolados do presente estudo uma vez que nenhum experimento com esse fim foi realizado.

A resistência às tetraciclinas é muito comum entre os bacilos Gram-negativos entéricos portadores de plasmídeos R conjugativos. Esta alta prevalência da resistência a estes antibióticos deve-se à transmissibilidade de plasmídios e parece estar relacionada com a proximidade dos genes que determinam a resistência com a parte do plasmídeo que comanda a transferência. Além das enterobactérias, plasmídios com genes determinantes de resistência às tetraciclinas tem sido identificados em *H. influenzae*, *Bacillus sp.*, *Vibrio cholerae*, entre outras. Nas enterobactérias foram descritos quatro tipos de genes determinantes de resistência às tetraciclinas, denominados Tet-A, -B, -C e -D, os quais eventualmente podem localizar-se em transposons ligados a plasmídios ou ao cromossomo (TAVARES, 2001).

No entanto, alguns estudos demonstraram que os genes mais freqüentes em *Aeromonas* são o *tetA* e o *tetE* e que esses dois genes codificam uma bomba de efluxo (BALASSIANO et al., 2007).

5.3.2 Cloranfenicol

O cloranfenicol foi originalmente isolado de *Streptomyces venezuelae* em 1947, esse antibiótico se mostrou ser de amplo espectro, com a atividade de inibir a biosíntese protéica bacteriana, agindo na subunidade 50S do ribossomo (SCHWARZ et al., 2004). Com o passar dos anos as bactérias desenvolveram resistência a esse antibiótico, como pode ser observado no presente estudo, no qual foram identificadas 03 *Aeromonas* resistentes ao cloranfenicol (quadro 16).

O mecanismo mais comum de resistência ao cloranfenicol é produzido pela enzima CAT, que é codificada pelo gene *cat* e pode ser transportado por plasmídeos, ou por um transposon. As enzimas CAT são capazes de acetilar o cloranfenicol na dependência da acetilcoenzima A, sendo esse mecanismo denominado acetilação enzimática da droga. Ou seja, a enzima CAT na presença da acetilcoenzima A como fonte acetiladora, catalisa a acetilação do antibiótico em seu grupamento hidroxila localizado no carbono 3, levando a formação do cloranfenicol 3-acetato (desprovido de atividade antimicrobiana) (TAVARES, 2001; SCHWARZ et al., 2004).

As enzimas CAT isoladas das cepas resistentes não são idênticas, variando em sua composição de aminoácidos e propriedades físicas e químicas, entretanto, a ação enzimática das diversas variantes da enzima é similar (TAVARES, 2001). Já foram descritas 16 grupos distintos dessas enzimas A-1 a A-16 (SCHWARZ et al., 2004)

Também já foram descritos como forma de resistência bacteriana o sistema de bomba de efluxo, a mutação do sítio alvo que é o ribossomo, e a alteração na permeabilidade desse antibiótico pela parede celular (SCHWARZ et al., 2004). Porém, não foram realizados testes para determinar o mecanismo de resistência a essa classe de antibióticos no presente estudo.

Existem dois trabalhos que estudaram a resistência ao cloranfenicol em *Aeromonas* coletadas em rios. Um deles é o estudo desenvolvido por GOÑI-URRIZA et al. (2000) que detectaram *Aeromonas* em 2% das suas amostras, coletadas em rios da Europa, resistentes ao cloranfenicol e isso pode ter ocorrido pela diminuição da permeabilidade da membrana. E o outro é o trabalho desenvolvido por

ZWENGER e GILLOCK (2009) no qual o autor detectou *Aeromonas hydrophila* resistente ao antibiótico cloranfenicol de amostra de rio no Kansas -EUA.

5.3.3 Fluoroquinolonas

Esses antibióticos são utilizados em casos clínicos e veterinários, são antibióticos de ação genotóxica, agem como bactericida, já que interferem na síntese de DNA bacteriano, inibindo a DNA-girase. A DNA girase e a topoisomerase IV (gene *parC*) são enzimas heterotetrameras formadas por dois tipos de subunidades a GyrA e GyrB da DNA girase e ParK e ParE da topoisomerase IV (SINHA et al., 2004).

No estudo desenvolvido por CATTOIR et al. (2008) foram obtidos isolados ambientais de *Aeromonas* resistentes à essa classe de antibióticos enquanto os resultados do presente estudo diferem muito pouco dos obtidos por esses autores uma vez que não foram observados isolados apresentando resistência ao ácido nalidíxico e nem ciprofloxacilina (quadro 16). Por outro lado, nossos resultados corroboram os achados de HUDDLESTON (2006) que obtiveram sensibilidade à esses antibióticos em todos os isolados de *Aeromonas* analisados.

A resistência às fluoroquinolonas, como o ácido nalidíxico e a ciprofloxacilina é considerada uma resistência proveniente da ação de genes cromossômicos e não derivados de elementos genéticos. Ou seja, essa resistência pode ocorrer por uma mutação cromossômica nos genes que são responsáveis pela DNA girase e a topoisomerase IV, ou pela alteração da permeabilidade à droga através da parede celular bacteriana (porinas), ou ainda pela ação da bomba de efluxo que possibilita a retirada da droga do interior celular (GOÑI-URRIZA et al., 2002; SINHA et al., 2004 e CATTOIR et al., 2008).

No entanto em estudos realizados por RUIZ (2003), este detectou um gene transportado por plasmídeo chamado *qnr* que é capaz de proteger a DNA girase da ação dos antibióticos do tipo quinolonas. Alguns anos mais tarde, CATTOIR et al. (2008) detectaram esse gene em *Aeromonas*, sendo essas bactérias consideradas reservatório para esse gene no meio aquático.

No Brasil esse antibiótico é utilizado para infecções produzidas por *Aeromonas* e em casos mais graves, mas em alguns países da Europa e nos Estados Unidos é usada amplamente na veterinária e na agricultura e devido a esse uso indiscriminado está sendo observado o aumento de bactérias resistentes a estes antibióticos. Acredita-se que a presença desse antibiótico na água seleciona as bactérias resistentes (GOÑI-URRIZA et al., 2002).

Como no Brasil as quinolonas não são amplamente utilizadas na clínica como em outros países, essa ação pode ser a responsável pelo aparecimento de poucas *Aeromonas* coletadas do ambiente aquático que fossem resistentes aos antibióticos do tipo quinolonas.

No entanto, o fato de 03 isolados do presente estudo terem apresentado resistência intermediária ao ácido nalidixico pode servir de alerta para uso desse antibiótico e à emergência de resistência nos isolados ambientais. De acordo com GOÑI-URRIZA et al. (2002) as bactéria do gênero *Aeromonas* são extremamente sensíveis à esses antibióticos, no entanto estudos realizados em rios da Europa demonstraram que existe um número significativo de *Aeromonas* resistentes ao ácido nalidixico.

5.3.4 Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos inibem a síntese da parede celular das bactérias. Essa interferência leva à formação de uma parede celular defeituosa, com instabilidade de permeabilidade provocando a morte da bactéria por lise. Para se defender da ação desses antibióticos as bactérias sintetizam enzimas denominadas carbapenemases. As enzimas carbapenemases são divididas em duas famílias tendo como características os seus mecanismos de hidrolises e seus sítios ativos (QUEENAN e BUSH 2007).

As duas famílias são as carbapenemases serina dependente no seu sitio ativo e a outra é zinco dependente. As carbapenemases serina dependente são inibidas pelo ácido clavulânico e não são inibidas pelos EDTA enquanto ao zinco dependente são inibidas pelo EDTA (QUEENAN e BUSH 2007).

Uma carbapenemase importante é a metalo- β -lactamase que além de agir nos carbapenêmicos agem também nas cefalosporinas e nas ampicilinas. As *Aeromonas*

sintetizam a enzima CphA que é uma metalo- β -lactamase (QUEENAN e BUSH 2007). No entanto, a enzima CphA somente age nos carbapenêmicos não possuindo atividades ou muito pouca atividade para as cefalosporinas e para ampicilinas (BALSALOBRE et al., 2009a).

Nesse trabalho 21(84,0%) forma positivas para o *bla*_{CphA} pela PCR, mas mesmo o gene estando presente nas *Aeromonas* (quadro 17 e 19) 12(48,0%), algumas vezes não apresentaram resistência aos carbapenêmicos utilizados e também não apresentaram a produção da enzima MBL. Esses resultados demonstram que mesmo o gene estando presentes nas *Aeromonas* ele, algumas vezes não é capaz de expressar a produção da enzima capaz de quebrar esses carbapenêmicos (BALSALOBRE et al., 2009a)

Os carbapenêmicos, cujos representantes mais amplamente utilizados são os imipenem e o meropenem, são considerados agentes terapêuticos de escolha para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias resistentes aos demais β -lactâmicos, especialmente nas localidades onde as taxas de prevalência de resistência são elevadas (TAVARES, 2001).

De acordo com os resultados obtidos 4(16%) das cepas estudadas não possuíam o gene *cphA*, no entanto 03 destas apresentaram resistência ao carbapenêmicos utilizados, como não há muitos estudos em relação à resistência das *Aeromonas* não se sabe todas as causas dessa resistência, no entanto, outro organismo conhecidamente de ambiente aquático é a *P. aeruginosa*.

E como se sabe que a *P. aeruginosa* desenvolve resistência aos β -lactâmicos através da perda ou da redução da expressão de proteínas de membrana externa, como porinas; a hiperexpressão de bombas de efluxo; as alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), sendo assim pode-se imaginar que as *Aeromonas* podem trocar material genético com *P. aeruginosa*, e então podemos sugerir que uma dessas seja a forma em que as *Aeromonas* desse trabalho encontraram para se defender dos antibióticos utilizados (TAVARES, 2001).

5.3.5 Cefalosporinas

Como os outros β -lactâmicos as cefalosporinas inibem a síntese da parede celular das bactérias. Essa interferência leva à formação de uma parede celular defeituosa, com instabilidade de permeabilidade provocando a morte da bactéria por lise. As cefalosporinas são divididas em 4 gerações a primeira geração é representada pelas cefalotinas; a segunda geração são as cefoxitinas; a terceira geração são as cefotaximas, cefodizimas, cefpodoximas e ceftazidimas e por último a quarta geração que são as cefepimes (TAVARES, 2001).

As bactérias podem desenvolver resistência às cefalosporinas pela produção das cefalosporinases como as enzimas denominadas AmpCs e as ESBLs. As quais os seus genes podem ser de origem cromossômicos ou plasmidiais. Os genes transportados por plasmídios bem como por outros elementos transponíveis tem grande importância já que pode ser transferido para outras bactérias e tem-se visto um aumento da prevalência deste tipo de mecanismo de resistência em Gram-negativos (TAVARES, 2001).

Nesse trabalho foi encontrado um alto índice de resistência a cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações (quadro 16). Estudos demonstraram que genes para as enzimas ampC (cefalosporinases) são encontradas nos cromossomos de várias bactérias Gram-negativas, no entanto estudos mais recentes vem observando aumento destes genes em plasmídios nas bactérias resistentes a cefalosporinas em amostras clínicas (REISBIG E HANSON, 2004).

Nesse estudo foi encontrado 2 *cepH* e 5 gene tipo *bla*_{MOX} (quadro 19) e estudos anteriores já demonstraram em *Aeromonas* sp. a presença de ampC como no caso da *A. caviae* que possuía uma ampC 96% de similaridade com a *bla*_{FOX} (REISBIG e HANSON, 2004). Essa resistência pode ter sido induzida pela presença das cefoxitinas e imipenem (REISBIG e HANSON, 2004). Mesmo com os iniciadores novos descritos nesse trabalho não foi possível explicar a resistência de todas as cefalosporinas que as *Aeromonas* apresentaram.

Para combater os organismos Gram-negativos produtores de β -lactamases foram introduzidas as cefalosporinas das segunda e terceira gerações já que estes novos antibióticos não constituem substratos adequados para a ação hidrolítica das

enzimas. No entanto, tem sido verificado o surgimento de bactérias produtores de novos tipos de β -lactamases capazes de hidrolisar estes novos, como observados nesse trabalho (TAVARES, 2001).

Um motivo para essa resistência pode ser a interação da enzima com o antibiótico, sem haver hidrólise. Esta inativação resulta da forte ligação da enzima ao antibiótico, causando sua retenção ou aprisionamento, com isto bloqueando seu acesso aos seus receptores protéicos e impedindo a ação bactericida do antibiótico. Este tipo de resistência mediada por β -lactamases, na qual existe uma grande afinidade de ligação entre a enzima e o antibiótico, é denominada barreira não-hidrolítica (TAVARES, 2001). E outro modo de resistência a cefalosporinas pode ser pela produção das enzimas β -lactamases de espectros expandidos (ESBL).

A enzima TEM são as principais enzimas produzidas por plasmídios de bacilos Gram-negativos, constituindo as β -lactamases mais comuns em bactérias Gram-negativas resistentes isoladas de material clínico, com uma frequência média de 75% (TAVARES, 2001). No presente trabalho foi detectado o gene *bla*_{TEM} em 17 (68,0%) das cepas estudadas, no entanto não foi observado nenhuma produção de ESBL (quadro 18 e 19) esse resultado mostra que o gene *bla*_{TEM} presente no estudo não é produtor de uma ESBL.

Devido à facilidade de transmissão de plasmídios entre as espécies bacterianas, a resistência por β -lactamases mediadas por genes plasmidiais tem maior importância, pela sua frequência, do que a de origem cromossômica. Esta importância é aumentada pela existência do fenômeno da transposição, que permite a inserção dos genes cromossômicos em plasmídios e vice versa e de plasmídios para plasmídios, possibilitando com isto a constituição de plasmídios contendo genes mediadores da produção de diversas β -lactamases, entre outros mecanismos de resistência (TAVARES, 2001).

5.3.6 Aminoglicosídeos

Os antibióticos do tipo aminoglicosídeos penetram a parede celular e a membrana, ligando-se a subunidade ribossômica 30S, provocando erro na leitura de RNA mensageiro e consequentemente a morte de bactérias (TAVARES, 2001).

No Brasil os aminoglicosídeos são amplamente utilizados no meio clínico, em função da sua eficácia contra os bacilos Gram-negativos e de seu sinergismo positivo com outros antibióticos no tratamento de infecções por bactérias gram-positivas (OLIVEIRA et al., 2006).

Mesmo sendo muito utilizado em pacientes esse antibiótico apresenta nefrotoxicidade que podem ocorrer em até 20% dos pacientes e consequentemente causar a morte destes (OLIVEIRA et al., 2006).

No presente estudo foram detectadas 01 resistência a gentamicina e 02 a estreptomicinas (quadro 16). A bactéria pode ficar resistente mudando o sítio de ação do antibiótico, o ribossomo, ou por modificações no sistema de transporte destas drogas para o interior da célula (TAVARES, 2001).

A gentamicina é inativada pela gentamicina-2-acetiltransferase e as bactérias resistentes, são capazes de fosforilar, acetilar, ou adenilar os aminoglicosídeos. No entanto, essas enzimas dependem da existência de sítios na molécula dos antibióticos sensíveis aos seus ataques (TAVARES, 2001).

As enzimas inativadoras dos aminoglicosídeos são codificadas em genes situados em transposons, em cromossomo e em plasmídios e a capacidade de sua produção pode ser adquirida pelo microrganismo através da conjugação. As enzimas inativadoras são constitutivas, não sendo induzidas pela presença do aminoglicosídeo e se localizam no espaço periplasmático das bactérias (TAVARES, 2001).

Estudos sobre as resistências aos diversos aminoglicosídeos em diferentes partes do mundo vêm mostrando elevada resistência das bactérias Gram-negativas à gentamicina. Estes antibióticos apresentam múltiplos sítios de ataque para as enzimas que são produzidas por estes microrganismos, quanto maior a pressão de seleção pelo amplo uso das drogas, mais frequente é o encontro de bacilos Gram-negativos produtores das enzimas ativas (TAVARES, 2001).

A maneira pela qual as enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos produzem resistência não está elucidada. No entanto, acredita-se que o antibiótico modificado chega ao ribossomo bacteriano, mas não se liga ao seu receptor, desta maneira tornando-se incapaz de inibir a síntese protéica bacteriana. Além disso, o acúmulo dos antibióticos aminoglicosídeos modificados no interior da célula causaria a saturação do mecanismo de transporte das drogas para o meio intracelular,

bloqueando a penetração de aminoglicosídeos externos não modificados (TAVARES, 2001).

Outro modo de resistência aos aminoglicosídeos pode ser por meio de mutações que afetam o metabolismo energético da membrana, com isto diminuindo a diferença de potencial através da membrana e reduzindo a penetração dos antibióticos. Este tipo de “impermeabilidade”, relacionada com a diminuição do transporte ativo dos aminoglicosídeos para o interior da célula, habitualmente é causada para a resistência cruzada, ou seja, a bactéria passa a ser resistente a vários ou a todos os antibióticos desta família. (TAVARES, 2001).

Outro meio de resistência bacteriana é no local de ação dos aminoglicosídeos, que é no ribossomo, no qual o ribossomo bacteriano pode sofrer no seu receptor alterações em sua constituição devidas a mutações em genes cromossômicos e com isso o aminoglicosídeo não se liga (TAVARES, 2001).

Essas modificações ou a ausência de proteínas do ribossomo resultam em resistência aos macrolídeos e aos aminoglicosídeos. Por exemplo, a ausência da proteína L₆, da subunidade 50S do ribossomo da *Escherichia coli* causa resistência à gentamicina, enquanto a ausência ou modificações de aminoácido da proteína S₁₂ da subunidade 30S da *E. coli* provoca resistência à estreptomicina. (TAVARES, 2001).

Alterações no RNA ribossomal podem causar resistência a clindamicina e aminoglicosídeos. A resistência a estreptograminas frequentemente resulta de metilação da adenina presente no RNA 23S, um componente da subunidade 50S do ribossomo bacteriano (TAVARES, 2001).

Os genes mediadores da metilação do RNA surgem por mutações no cromossomo bacteriano, enquanto a indução da resistência é consequente a genes localizados em transposons situados em um plasmídio. A metilação RNA diminui a afinidade dos macrolídeos com seu receptor e, desta maneira, estes antibióticos deixam de exercer sua ação inibitória na síntese protéica. A resistência aos macrolídeos e as lincosamidas por alteração do RNA ribossomal tem sido identificada principalmente em *S. aureus* (TAVARES, 2001).

No presente trabalho não foi possível concluir por qual meio as *Aeromonas* utilizaram para impedir a ação dos aminoglicosídeos estudados.

5.3.7 Inibidores da Via do Folato

O mecanismo de ação desses antibióticos nos microrganismos sensíveis se dá no momento da incorporação do ácido para-aminobenzoico (PABA), substâncias extracelulares necessária para a formação do ácido diidrofolico, sendo essa última substância necessária para produção das porinas e na síntese dos ácidos nucleicos. Então os sulfonamidas competem com o PABA, inibindo assim a produção de diidropteroato sintetase, consequentemente inibe o crescimento bacteriano (SKÖLD, 2001).

O trimetoprim (análogo ao ácido fólico) é um dos agentes mais ativos que exerce efeito sinérgico quando utilizado com uma sulfonamida. Trata-se de um poderoso inibidor competitivo seletivo da diidrofolato redutase microbiana, a enzima que reduz o diidrofolato em tetraidrofolato. Essa forma reduzida do ácido fólico é necessária para as reações de transferência de um carbono. Portanto, a administração simultânea de uma sulfonamida e do trimetoprim induz bloqueios sequenciais na via de síntese do tetraidrofolato do microrganismo a partir de moléculas precursoras (SKÖLD, 2001).

Nesse trabalho foi encontrado um isolado (cepa FSP 398/08) resistente ao trimetoprim-sulfametoxazol (quadro 16).

O mecanismo para ocorrer a resistência bacteriana aos trimetoprim-sulfametoxazol é a síntese de uma diidropteroato alternado, sem afinidade pelas sulfonamidas, e assim o diidropteroato alterado mantém suas atividades bioquímicas na produção do folato. E o mecanismo é semelhante em relação ao trimetoprim, na fase seguinte da síntese do ácido fólico, na redução ao tetraidrofolato pela diidrofolato redutase (SKÖLD, 2001).

De acordo com SKÖLD (2001) essa resistência pode ocorrer pela aquisição de dois genes *sul 1* e *sul 2*. O gene *sul 1* é encontrado num integron de classe 1, enquanto o *sul 2* é encontrado num pequeno plasmídeo.

Como foi observado no presente trabalho, as bactérias ambientais como as *Aeromonas* estão adquirindo resistência aos antibióticos utilizados na clínica o que torna relevante as considerações propostas por JONES e PFALLER, (1998) que postulam a necessidade sobre a necessidade de estudos que organizem essas

resistências emergenciais e assim sejam direcionadas as intervenções necessárias para esse problema de saúde pública. Os autores também julgam necessário que haja educação dos profissionais da saúde e da população em geral, e que pesquisas proponham novos modos de prevenção e cura de doenças infecciosas, diminuindo assim o uso dos antibióticos.

Com os avanços tecnológicos outros alvos estão sendo estudados com a finalidade de combater bactérias e fungo (WENCEWICZ et al., 2009). Esses estudos são necessários devido ao aumento na incidência da resistência aos antibióticos existentes. Então grupos de pesquisadores como WENCEWICZ et al. (2009) têm demonstrado que os sistemas de captação de ferro em bactérias são alvos adequados para o desenvolvimento de tais terapias. Por exemplo, o uso do sideróforos das bactérias como agentes de entrega da droga podem ignorar mecanismos de resistência associados à membrana (tais como diminuição da permeabilidade e barreiras de efluxo) e aumentar a potência das drogas em até 100 vezes a difusão passiva, limitando a resistência.

Em um estudo desenvolvido por CHANG et al. (2007) em *Aeromonas* multiresistentes os autores detectaram a presença de integrons que podem ser importante na resistência ao trimetoprim/sulfametoxazol. Concluíram que os organismos do gênero *Aeromonas* desempenham um papel importante na transferência de genes de resistência aos antibióticos entre as populações bacterianas na natureza, uma vez que nesse mesmo estudo os autores conseguiram identificar 10 cassetes gênicos que são frequentemente encontrados em isolados Gram-negativos clínicos e ambientais. Os autores também sugeriram que a transferência de genes de resistência a antibióticos pode ocorrer através de cassetes gênicos no integrom de classe I entre *Aeromonas* e as outras bactérias.

Hoje, ainda não se tem uma metodologia adequada para identificação das espécies do gênero *Aeromonas*, pois esse gênero vem sofrendo muitas mudanças na sua taxonomia nesses últimos anos. a série bioquímica utilizada na detecção clínica foi formulada antes da determinação das espécies que atualmente são reconhecidas. Outro problema é que as espécies do gênero das *Aeromonas* são confundidas, comumente, com *E. coli* e *vibrio* spp.. Esta falta de definição sobre taxonomia e também como essas bactérias realmente se comportam na água, no ser humano e na

presença dos antibióticos comumente usados, podem representar um problema para a saúde pública porque não se sabe se o isolado de determinado ambiente pode ou não produzir toxina, ou ser um risco mais sério que uma gastroenterite em pessoas já debilitadas, ou mesmo saudáveis (, JANDA,1991, ABBOTT et al., 2003).

6. Conclusão

- A comparação das espécies identificadas fenotipicamente com a genotípica apresentou divergências, demonstrando que o seqüenciamento do gene *gyrB* poderia ser proposto para a identificação final de bactérias do gênero *Aeromonas*. Duas novas espécies são propostas como novos integrantes desse gênero, porém estudos adicionais são necessários para complementação desse achado.
- Os resultados da presença de genes de resistência e virulência demonstraram que as espécies do gênero *Aeromonas*, utilizadas nesse estudo, possuem potencial patogênico para o homem e que esses organismos podem servir como importante reservatório de resistência aos antimicrobianos para outros microrganismos responsáveis por casos clínicos em humanos.
- O presente estudo fornece subsídios para elucidação das rotas de aquisição de genes de resistência aos antibióticos por microrganismos patogênicos para o homem demonstrando, com base no gênero *Aeromonas* que o ambiente pode servir como uma importante fonte de informação para se antever a emergência desses genes na clínica e no ambiente hospitalar.
- Os antibióticos eventualmente presentes na água podem selecionar bactérias resistentes, e conseqüentemente manter os genes de resistência circulando entre as bactérias do ambiente e clínicas.

BIBLIOGRAFIA

Abbott SL, Wendy KWC, Janda JM. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. J Clin Microbiol. 2003; 41(6): 2348-2357.

Agarwal S, Gopal K, Upadhyaya T, Dixit A. Biochemical and functional characterization of UPD-galactose 4-epimerase from *Aeromonas hydrophila* Bichim Biophys Acta. 2007; 1774; 828–837.

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

Aguilera-Arreola MG, Hernandez-Rodriguez C, Juniga G, Figueras MJ, Garduno RA, Castro-Escarpulli G. Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: a comparative study. Can J Microbiol. 2007; 53:877-887.

Akinbowale OL, Peng H, Grant P, Barton MD. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. Int J Antimicrob Agents. 2007; 30: 177–182.

Aperi A, Figueras MJ, Inza I, Martínez-Murcia AJ. Analysis of 16S rDNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. Int Microbiol. 2008; 11: 185-194.

Alperi A, Martínez-murcia AJ, Ko WC, Monera A, Saavedra MJ, Figueras MJ. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., two new clinical species from Taiwan. Int. J. Int. Evol. Microbiol. Papers in Press 2009

Alperi A, Martínez-murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Figueras MJ. *Aeromonas fluvialis* sp. nov. isolated from a Spanish river. Int J Syst Evol Microbiol. 2010; 60: 72-77.

Aoki T, Satoh T, Kitao T. New tetracycline resistance deterterminant on R plasmids from *Vibrio anguillarum*. Antimicrob Agents Chemother. 1987; 31 (9): 1446-1449.

Arakawa Y., Shibata N., Shibayama K., Kurokawa H., Yagi t., Fujiwara H., Goto M. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J clin microbiol. 2000; 38 (1):40-43.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Short protocols in Molecular Biology 1995. John Wily & Sons, USA.

Avison MB, Niumpson P, Walsh TR, Bennett PM. *Aeromonas hydrophila* AmpH and CepH β -lactamases: derepressed expression in mutants of *Escherichia coli* lacking *creB*. J Antimicrob chemother. 2000; 46: 695-702.

Bahlaoui MH, Baleux B, Troussellier M. Dynamics of pollution-indicator and pathogenic bacteria in high-rate oxidation wastewater treatment ponds. Water Res. 1997; 3(31): 630-638.

Balassiano IT, Basto MCF, Madureira DJ, Silva IG, Freitas-Almeida, Oliveira SS. The involvement of *tetA* and *tetE* tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2007; 102 (7): 861-866.

Balsalobre LC, Dropa M, Lincopan N, Mamizuka EM, Matté GR and Matté MH. Detection of metallo- β -lactamases-encoding genes in environmental isolates of

Aeromonas hydrophila and *Aeromonas jandaei*. Lett Appl Microbiol. 2009a; 49: 142–145.

Balsalobre LC, Dropa M, Matté GR, Matté MH. Molecular detection of enterotoxins in environmental strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. J Water Health. 2009b; 7 (4):685-91.

Balsalobre LC, Dropa M, Oliveira DE, Lincopan N, Mamizuka EM, Matté GR, Matté MH. Presence of *bla*_{TEM-116} gene in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* from Brazil. In press. 2010.

Bauer A, Rørvik LM. A novel multiplex PCR for the identification of *Vibrio Parahaemolyticus*, *Vibrio cholera* and *Vibrio vulnificus*. Lett Appl Microbiol. 2007; 45:371-375.

Bebrone C, Anne C, Vriendt K, Devreese B, Rossolini GM, Beeumen JV, Frère JM, Galleen M. Dramatic broadening of the substrate profile of the *Aeromonas hydrophila* CphA Metallo-lactamase by site-directed mutagenesis. J Biol. Chemistry 2005; 280 (31): 28195-28202.

Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Figueras MJ, Romalde JL. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. Syst Appl Microbiol. 2009; 32: 471–479.

Benchokroun S, Imziln B, Hassani L. Solar inactivation of mesophilic *Aeromonas* by exogenous photooxidation in high-rate algal pond treating waste water. J Appl Microbiol. 2003; 94: 531-439.

Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol. 2001; 14: 933–951.

Brandi G, Sisti M, Giardini F, Schiavano GF, Albano A. Survival ability of cytotoxic strains of motile *Aeromonas* spp. in different types of water. Lett Appl Microbiol. 1999; 29: 211-215

Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation to molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 1995; 39:1211-1233.

Bush K. Metallo- β -Lactamases: A Class Apart. Clin Infect Dis. 1998; 27:48–53.

Bush K. Jacoby GA. An Updated Functional Classification of β -Lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 2009; 54(3):969-76.

Bush K, Jacoby GA. Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-spectrum and Inhibitor Resistant β -lactamases. Lahey Clinic [homepage na internet] c 2010 [acesso em 28 maio 2010]. Disponível em: <http://www.lahey.org>

Cabrera LER, Castro GE, Ramirez AM, Llop AH, Llanes RC, Castaneda EN, Fernandez AA, Bravo LF. Aislamiento e identificación de especies pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* procedentes de muestras extra-intestinales em Cuba. Ver Chil Infect 2007; 24 (3): 204-208.

Cao V, Lambert T, Nhu DQ, Loan HK, Hoang NK, Arlet G, Courvalin P. Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clin isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. Antimicrob Agents Chemoter. 2002; 46: 3739-3743.

Carattoli A. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella entérica*. Curr Issues Mol Biol. 2003; 5: 113-122.

Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt RJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1} encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48 (12): 4654-4661.

Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Calude-James S, Nordmann P. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis* 2008; 14 (2): 231-236.

Cavallo RA, Rizzi C, Vozza T, Stabili L. Viable heterotrophic bacteria in water and sediment in 'Mar Piccolo' of Taranto (Ionian Sea, Italy). *J Appl Microbiol* 1999; 86: 906-916.

Chacon MR, Figueras MT, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro J. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* 2003; 84(4): 269-278.

Chang CY, Shih DY, Wang JY, Yanga SS. Molecular characterization of class 1 integrons and antimicrobial resistance in *Aeromonas* strains from foodborne outbreak-suspect samples and environmental sources in Taiwan. *Diagnostic Microbiol Infect Dis*. 2007; 59:191-197.

Chapman, P. A., Ellin, M., Ashton, R., Shafique, W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *Int J Food Microbiol*. 2001; 68: 11-20.

Chim H, Song C. *Aeromonas* infection in critically ill burn patients. *Burns*. 2007; 33: 756- 759.

Colwell RR, Macdonell MT, Deley J. Proposal to recognize the family Aeromonadaceae fam. Nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1986; 36(3): 473-477.

Costa FN, Rossi ODJ, Amaral LA. Ação de antimicrobianas sobre estirpes de *Aeromonas* isoladas em diferentes pontos da linha de processamento de frangos. *Rev Portuguesa de Ciênc vet*. 2003; 98 (546): 95-99.

Costa FN, Junior ODR. Enterotoxigenicidade de espécies de *Aeromonas* isoladas em diferentes pontos do fluxograma de abate de frangos. Arq Inst Biol 2007; 74 (1): 5-9.

Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. J Clin Microbiol. 2000; 38:1791–1796.

Couto CRA, Oliveira SS, Queiroz MLP, Freitas-Almeida AC. Interactions of clinical and environmental *Aeromonas* isolates with caco-2 and HT29 intestinal epithelial cells. Lett Appl Microbiol. 2007; 45: 405-410.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria, M45-A. Wayne, PA: CLSI: 2006

CLSI - Clinic and Laboratory Standards Institue (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth International Supplement. CLSI Publication M100-S19, Wayne, PA :CLSI: 2009.

Dalmarco EM, Blatt SL, Córdova CMM. Identificação Laboratorial de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs)– Revisão. RBAC. 2006; 38(3): 171-177.

Demarta A, Küpfer M, Riegel P, Harf-Monteil C, Tonolla M, Peduzzi R, Monera A, Saavedra MJ, Martínez-Murcia MJ. *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. Syst Appl Microbiol. 2008; 31: 278–286.

Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. Clin Infect Dis. 2001; 1387-1392.

Epple HJ, Mankertz J, Ignatius R, Liesenfeld O, Fromm M, Zeitz M, Chakraborty T, Schulzke JD. *Aeromonas hydrophila* beta-hemolysin induces active chloride secretion in colon epithelial cells (HT-29/B6). *Infect. Immun.* 2004; 72(8): 4848-58.

Falcão DP, Lustri WR., Bauab TM. Incidence of non-01 *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* spp. in fresh water in Araraquara, Brazil. *Current Microbiol.* 1998; 37:28-31.

Figueras MJ, Alperi A, Saavedra MJ, Wen-Chien K, Gonzalo N, Navarro M, Martínez-Murcia AJ. Clinical Relevance of the Recently Described Species *Aeromonas aquariorum* J Clin Microbiol. 2009; 47 (11): 3742–3746.

Figueras MJ, Alperi A, Beaz-Hidalgo R, Stackebrandt E, Brambilla E, Monera A, Martínez-Murcia AJ. *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet in Germany. *IJSEM. Papers in Press* 2010.

Fosse T, Giraud-Morin C, Madinier I, Labia R. Sequence analysis and biochemical characterization of chromosomal CAV-1 (*Aeromonas caviae*), the parental cephalosporinase of plasmid-mediated AmpC ‘FOX’ cluster. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 222: 93-98.

Franceschini N, Caravelli B, Jean-Denis D, Galleni M, Jean-Marie f, Ammmicosante G, Rossolini GM. Purification and biochemical characterization of the VIM-1 metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44 (11): 3003-3007.

Galbis DM, Fafan M, Fuste C, Loren JG. *Aeromonas molluscorum* sp. nov. isolated from bivalve *mollusks*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54: 2073-2078.

Ghatak S, Agarwal RK, Bhilegaonkar KN. Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. Lett Appl Microbiol. 2007; 44: 550-554.

Girlich D, Poirel L, Nordmann. PER-6, an Extended-spectrum β -lactamase from *Aeromonas allosaccharophila*. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54 (4): 1619-1922.

Goñi-Urriza M, Pineau L, Capdepuy M, Roques C, Caumette P, Quentin C. Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. Isolated from two European rivers. J Antimicrob. Chemother. 2000; 46: 297-301.

Goñi-Urriza M, Arpin C, Capdepuy M, Dubois V, Caumette P, Quentin C. Type II Topoisomerase Quinolone Resistance-Determining Regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, and *A. sobria* complexes and Mutations Associated with Quinolone Resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46:2: 350-359.

Gordon L, Cloeckaert A, Double B, Schwarz S, Bouju-Albert A, Ganière JP, Bris L, Flèche-maté AL, Giraud E. Complete sequence of the floR-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. J Antimicrob Chemother. 2008; 62: 65–71.

Granum PE, O’Sullivan K, Tomas JM. Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. from food and water. FEMS Immunol Medical Microbiol. 1998; 21: 131-137.

Haldorsen IB, Aasnaes IB, Dahl KH, Hanssen AM, Simonsen GS, Walsh TR, Sundsfjord A, Lundblad EW. The AmpC phenotype in Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* is associated with an acquired ISEcp1-like ampC element or hyperproduction of the endogenous AmpC. J Antimicrob Chemother. 2008; 62: 694–702.

Hall RM, Collis CM. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updat*. 1998; 1: 109-119.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 1999; 41:95-98.

Hancock REW, Brinkman FSL. Function of *pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu. Rev. Microbiol*. 2002; 56: 17–38.

Harf-Monteil C, Fleche AL, Riegel P, Prevost G, Bermond D, Grimont PA, Monteil H. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004; 54: 481–485.

Hayes SL, Rodgers MR, Lye DJ, Stelma GN, Mckinstry CA, Malard JM, Vesper SJ. Evaluating virulence of waterborne and clinical *Aeromonas* isolates using gene expression and mortality in neonatal mice followed by assessing cell culture's ability to predict virulence base don transcriptional response. *J Appl Microbiol*. 2007; 103: 811-820.

Heuzenroeder MW, Wong CYF, Flower RLP. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiol Lett*. 1999; 177: 131-136.

Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, Takemura H, Tanaka H, Yoshida R, Matsuda J, Matsuda J, Nakano M, Tomono K, Maesaki S, Kaku M, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. *Antimicrob Agents chemother*. 1998; 42 (8): 2006-2011.

Hofer E, Reis CMF, Theophilo GND, Cavalcanti VO, Henriques MFCM. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2006; 39(2): 217-220.

Honcocki REW e Brinkmann FSL. Function of *Pseudomonas* Porins in Uptake and Efflux. Annu Rev Microbiol. 2002; 56:17–38.

Hopkins KL, Batchelor MJ, Liebana E, Deheer-Graham AP, Threlfall EJ. Characterisation of CTX-M and *AmpC* genes in human isolates of *Escherichia coli* identified between 1995 and 2003 in England and Wales. Int J Antimicrob Agents. 2006; 28: 180–192.

Horsfall LE, Garau G, Liénard BMR, Dideberg O, Schofield CJ, Frère JM, Galleni M. Competitive Inhibitors of the CphA Metallo- β -Lactamase from *Aeromonas hydrophila*. Antimicrob Agents chemother. 2007; 51 (6): 2136–2142.

Huddleston JR, Zak JC, Randall MJ. Antimicrobial Susceptibilities of *Aeromonas* spp. Isolated from Environmental Sources. Appl Environ Microbiol. 2006; 72 (11): 7036–7042.

Imamura T, Kobayashi H, Khan R, Nitta H, Okamoto K. Induction of vascular leakage and blood pressure lowering through kinin release by a serine proteinase from *Aeromonas veronii* bv *sobria*. J Immunol. 2006; 177: 8723- 8729.

Imzilen B, Krovacek K, Baloda BS, Kuhn I, Rey CG, Svenson SB. Characterisation of potential virulence markers in *Aeromonas caviae* isolated from polluted and unpolluted aquatic environments in Morocco. FEMS Microbiol Ecol. 1998; 27: 153-161.

Ivanova EP, Romanenko LA, Matté MH, Matte GR, Lysenko AM, Tsukamoto KK, Sawabe T, Vysotskii MV, Frolova GM, Mikhailov V, Christen R, Colwell RR. Retrieval of the species *Alteromonas tetraodonis* Simidu et al.. 1990 as

Pseudoalteromonas tetraodonis comb. nov. and emendation of description. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51: 1071–1078.

Jacobs L, Chenia HY. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. Int J Food Microbiol. 2007; 114: 295–306.

Janda J M. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. Clin Microbiol Rev. 1991; 4(4): 397-410.

Jimenez N, Canal R, Saló MT, Vilches S, Merino S, Tomás JM. The *Aeromonas hydrophila* *wb₀₃₄* gene cluster: Genetics and Temperature Regulation. J Bacteriol. 2008; 190 (12): 4198-4209.

Jones RN, Pfaller MA. Bacterial Resistance: A Worldwide Problem. Diagn Microbiol Infect. Dis. 1998; 31: 379-388.

Joseph SW, Carnahan AM. Update on the Genus *Aeromonas*. ASM News. 2000; 66(4): 218-221.

Khajanchi BK, Sha J, Kozlova EV, Erova TE, Suarez G, Sierra JC, Popov VL, Horneman AJ, Chopra AK. N-Acylhomoserine lactones involved in quorum sensing control the type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and in vivo virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. Microbiol. 2009; 155: 3518–3531.

Khan MKR, Thukral SS, Gaiind R. Evolution a modified double-disc synergy test for detection of extended spectrum β -lactamase in AmpC β -lactamase-producing *Proteus mirabilis*. Indian J. Med. Microbiol. 2008; 26 (1): 58-61.

Kirov SM, The public health significance of *Aeromonas spp.* in foods. Int J Food Microbiol. 1993; 20: 179-198.

Kirov SM, Barnett TC, Pepe CM, Strom MS, Albert MJ. Investigation of the role of type IV *Aeromonas* pilus (Tap) in the pathogenesis of *Aeromonas* gastrointestinal infection. Infect Immunity. 2000; 68 (7): 4040-4048.

Ko WC, Wu HM, Chang TC, Yan JJ, Wu JJ. Inducible β -lactam resistance in *Aeromonas hydrophila*: Therapeutic Challenge for Antimicrob therapy. J Clin Microbiol. 1998; 36 (11): 3188-3192.

Kozinska A. Dominant pathogenic species of mesophilic *aeromonads* isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. J Fish Dis. 2007; 30: 293-301.

Laramée L, Lawrence JR, Greer CW. Molecular analysis and development of 16S rRNA oligonucleotide probes to characterize a diclofopmethyl-degrading biofilm consortium. Can J Microbiol. 2000; 46: 133-142.

Li MY, Zhou GH, Xu XL, Li CB, Zhu WY. Changes of bacterial diversity and main flora in chilled pork during storage using PCR-DGGE. Food Microbiol. 2006; 23: 607-611.

Libisch B, Giske CG, Kavács B, Tóth TG, Füzi M. Identification of the first metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain. J Clin Microbiol. 2008; 46 (5): 1878-1880.

Liebert CA, Hall RM, Summers A. Transposon Tn21, Floating Genome. Microbiol Mo. Biol Rev. 1999; 63(3): 507-522.

Livingstone D, Gill MJ, Wise R. Mechanisms of resistance to the carbapenems. J Antimicrob Chemother. 1995; 35: 1-5.

Luca F, Giraud-Morin C, Rossolini GM, Docquier JD, Fosse T., Genetic and biochemical characterization of TRU-1, the endogenous class C β -lactamase from *Aeromonas enteropelagenes*. Antimicrob agents Chemother. 2010; 54 (4): 1547-1554.

Marchandin H, Godreuil S, Darbas H, Jean-Pierre H, Jumas-Bilak, Chanal C, Bonnet R. Extended-Spectrum β -Lactamase TEM-24 in an *Aeromonas* Clinical train: Acquisition from the Prevalent *Enterobacter aerogenes* Clone in France. Antimicrob agents Chemother. 2003; 47 (12): 3994–3995.

Martin-Carnahan, A.; Joseph, S.W. Aeromonadaceae. In: Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T.; Garrity, G.M. (eds). *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, The Proteobacteria, Part B*. Vol.2, 2 edição, Springer-Verlag, New York, USA, p.556-578;2005.

Martins, GLA. Efeitos da emissão dos efluentes domésticos na proliferação de *Aeromonas* sp. em águas de superfície e pescado do estuário do Rio Bacanga, São Luís/MA. Dissertação de mestrado apresentada no Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará; 2005.

Martínez-Murcia AJ, Saavedra MJ, Mota VR, Maier T, Stackebrandt E, Cousin S. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquária of ornamental fish. Int J Syst Evol Microbiol. 2008; 58: 1169–1175.

Martínez-Murcia AJ, Monera A, Figueras MJ, Saavedra MJ. Phylogenetic Evidence Suggests That Strains of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Belong to the Species *Aeromonas aquariorum* sp. nov. Curr Microbiol. 2009; 58:76–80.

Martone-Rocha S, Piveli RP, Matté GR, Dória MC, Dropa M, Morita M, Peternella FA, Matté MH. Dynamics of *Aeromonas* species isolated from wastewater treatment system. J Watter Health. doi: 10.2166/wh.2010.140

Matté MH. Aplicação de Métodos Moleculares no Estudo de Organismos do Gênero *Aeromonas*. Dissertação de Livre Docência. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2004.

Matté MH, Baldassi L, Barbosa, ML, Malucelli MIC, Nitrini SMOO, Matte, GR. Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. Food Control, Reino Unido. 2007; 18: 747-751.

Mendes RE, Castanheira M, Pignatari ACC, Gales AC. Metallo- β -lactamases. J Brás Patolo med lab. 2006; 42 (2): 103-113.

Merino S, Rubires X, Knochel S, Tomás JM. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. Int J Food Microbio. 1995; 28: 157-168.

Messier N, Roy PH. Integron integrases possess a unique additional domain necessary for activity. J bacteriol. 2001; 183 (22): 6699-6706.

Miñana-Galbis D, Farfan M, Fusté MC, Lorén JG. *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. Int J Syst Evol Microbiol. 2004; 54: 2073–2078.

Miñana-Galbis D, Urbizu-Serrano A, Fusté MC, Lorén. Phylogenetic analysis and identification of *Aeromonas* species based on sequencing of the *cpn60* universal target. International J. Syst Evol Microbiol. 2009; 59; 1976–1983.

Miñana-Galbis D, Farfan M, Lorén JG, Fuste MC. Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. Syst Appl Microbiol. 2010; 33: 15-19.

Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 1980; 8: 4321-4325.

Naas T, Sougakoff W, Casetta A, Nordmann P. Molecular Characterization of OXA-20, a novel class D β -lactamase, and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42 (8): 2074-2083.

National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. National Health Institutes. PubMed [base de dados na internet]. Washington, DC; updated 2010 jan; acesso em 15 jan 2010. Disponível em: www.ncbi.nih.gov/genbank

Nawaz M, Sung K, Khan SA, Khan A.A, Steele R. Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. *Appl Environmental Microbiol*. 2006; 72 (10): 6461-6466.

Neuwirth C, Siebor E, Robin F, Bonnet R. First occurrence of an IMP metallo- β -lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. *Antimicrob Agents Chemotherapy*. 2007; 51 (12): 4486-4488.

Nhung PH, Hata H, Ohkusu K, Noda M, Shah M.M, Goto K, Ezaki T. Use of the novel phylogenetic marker *dnaJ* and DNA-DNA hybridization to clarify interrelationships within the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Evolut Microbiol*. 2007; 57: 1232-1237.

Nitta H, Kobayashi H, Irie A, Baba H, Keinosuke O, Imamura T. Activation of prothrombin by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*. 2007; *FEBS Lett*. 2007; 581 (30): 5935-5939.

Niumsop P, Simm AM, Nurmahomed K, Walsh TR, Bannett PM, Avison MB. Genetic linkage of the penicillinase gene, *amp*, and *blrAB*, encoding the regulator of β -lactamase expression in *Aeromonas* spp. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51: 1351-1358.

Nogueira, KS. Ocorrência de beta-lactamases de espectro ampliado em enterobactérias isoladas em dois hospitais universitários. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em microbiologia, parasitologia e patologia da Universidade Federal do Paraná em 2005.

Nomura T, Hajime H, Okamoto K. Carboxy terminal region of haemolysin of *Aeromonas veronii sobria* triggers dimerization. Microbial Pathogenesis. 2000; 28: 25-36.

Nordmann P, Poirel L, Kubina M, Casetta A, Naas T. Biochemical-Genetic characterization and distribution of OXA-22, a chromosomal and inducible class D β -lactamase from *Ralstonia (Pseudomonas) pichettii*. Antimicrob Agents Chemotherapy. 2000; 44 (8): 2201-2204.

Oliveira JFP, Cipullo JP, Burdmann EA. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. Braz J Cardiovasc Surg. 2006; 21(4): 444-452.

Overman TL, Janda JM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Aeromonas jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota* e *A. veronii* biotype *veronii*. J Clin Microbiol. 1998; 37 (3): 706-708.

Palú AP, Gomes LM, Miguel MAL, Balassiano IT, Queiroz ML, Freitas-Almeida AC, Oliveira SS. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolate. Food Microbiol. 2006; 23: 504-509.

Parks AR, Peters JE. Transposon Tn7 in widespread in diverse bacteria and forms genomic islands. J Bacteriol. 2007; 189 (5): 2170-2173.

Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman W. Dissemination of the metallo- β -Lactamase Gene *bla*_{IMP-4} among Gram-Negative Pathogens in a Clinical Setting in Australia. Clin Infect Dis. 2005; 41:1549–1556.

Pemberton JM, Kidd SP, Schmidt R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. FEMS Microbiol lett. 1997; 152: 1-10.

Pereira CS, Possas CA, Viana CM, Rodrigues DP. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*perna perna*) in natura e pre-cozidos no RJ. Cienc Tecnol Aliment. 2004; 24(4): 562-566.

Pérez-Pérez FJ e Hanson ND. Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002; 40 (6): 2153–2162.

Pianetti A, Sabatini L, Bruscolini F, Chiaverini F, Cecchetti G. Faecal contamination indicators, *Salmonella*, *Vibrio* and *Aeromonas* in water used for the irrigation of agricultural products. Epidemiol Infect. 2004; 132: 231-238.

Picão RC, Poirel L, Demarta A, Petrini O, Corvaglia AR, Nordmann P. Expanded-Spectrum β -Lactamase PER-1 in an Environmental *Aeromonas media* isolate from Switzerland. Antimicrob Agents Chemother. 2008a; 52 (9); 3461–3462.

Picão RC, Poirel L, Demarta A, Silva CSF, Corvaglia AR, Petrini O, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. J Antimicrob Chemother. 2008b; 62: 948-950.

Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol. 2005;43(7):3129-35.

Rahim Z, Khan SI, Ahmed OS, Islan DMN. Effect of Culture Conditions on Production of Cytotoxic Enterotoxin of *Aeromonas sobria*. Bangladesh J Microbiol. 2006; 23 (2): 171-173.

Rahman M, Simm R, Kader A, Basseres E, Römmling U, Möllby R. The role of c-di-GMP signaling in an *Aeromonas veronii* biovar *sobria* strain. Federation of European Microbiol Societies. 2007; 2: 1-8.

Rahman M, Huys EG, Kuhn EI, Rahman EM, Mollby ER. Prevalence and transmission of antimicrobial resistance among *Aeromonas* populations from a duckweed aquaculture based hospital sewage water recycling system in Bangladesh. Antonie van Leeuwenhoek. DOI 10.1007/s10482-009-9348-1. 2009

Reisbig MD, Hanson ND. Promoter sequences necessary for high-level expression of the plasmid-associated ampC β -lactamase gene *bla*_{mir-1}. Antimicrob Agents Chemotherapy. 2004; 48 (11): 4177-4182.

Roberts IS. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. Annual Rev Microbiol. 1996; 50: 285-315.

Rojas MVR, Matté MH, Dropa M, da Silva ML, Matté GR. Molecular characterization of strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in the southern coast of São Paulo, Brazil. Em preparação.

Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrob Chemother. 2003; 51: 1109-1117.

Saavedra MJ, Martínez-Murcia A, Mota V, Fontes C, Martins C, Correia A, Henriques I, Tação M, Carvalho MJ. Diversidade filogenética e resistência a antibióticos na microbiota de transmissão hídrica: um problema de segurança alimentar. Relatório para o Departamento de Ciência Veterinária. 2007.

Scheffer MC. Genotipagem e pesquisa de metalo-beta-lactamases em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos. Tese de mestrado pela Universidade Federal do Paraná; 2008.

Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004; 28: 519–542.

Sen K, Rodgers M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *J Appl Microbiol*. 2004; 97(5): 1077-1086.

Sköld O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res*. 2001; 32 (3-4): 261-273.

Sierra JC, Suarez G, Sha J, Foltz SM, Popov VL, Galindo CL, Garner R, Chopra AK. Biological characterization of a new type III secretion system effector from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*-Part II. *Microb Pathog*; 2007: 43 (4): 147-160.

Sinha S, Chattopadhyay S, Bhattacharya SK, Nair GB, Ramamurthy T. An unusually high level of quinolone resistance associated with type II topoisomerase mutations in quinolone resistance-determining regions of *Aeromonas caviae* isolated from diarrhoeal patients. *Res. Microbiol*. 2004; 155: 827-829.

Singh DV, Sanyal SC. Biochemical characteristics and enterotoxicity of *Aeromonas* species from man and environmental. *J Diarrh Dis Res*. 1992; 10 (4): 231-234.

Soler L, Yáñez, Chacon MR, Aguilera-Arreola MG, Catalán V, Figueras MJ, Martínez-Murcia. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004; 54: 1511-1519.

Subashkumar R, Vivekanandhan G, Raja SSS, Natarajaseenivasan K, Thayumanavan T, Lakshmanaperumalsamy P. Typing of *Aeromonas hydrophila* of

fish and human diarrhoeal origin by outer membrane proteins and lipopolysaccharides. *Indian J Microbiol.* 2007; 47: 46–50.

Szczuka E, Kaznowski A. Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp. Strains by Random Amplified Polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic intergenic consensus sequence PCR. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (1):220-228.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 2007; 24: 1596-1599

Tavares W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos. São Paulo: Atheneu; 2001.

Tendencia EA e Peña LD Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture.* 2001; 195: 193–204.

Thelestam M, Ljungh A. Membrane-damaging and cytotoxic effects on human fibroblasts of alpha-and beta-hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Inf. immunity.* 1981; 34(3): 949-956.

Thompson FL, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Swings J. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Syst Appl Microbiol.* 2001; 24: 520-538.

Uehara F. Concordância entre perfil de restrição do fragmento 16S rDNA e testes fenotípicos para determinação do posicionamento taxonômico de cepas de *Aeromonas*. Dissertação de mestrado. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2008.

Xu H, Davie J, Miao V. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *J bacterial.* 2007; 189 (17): 6276-6283.

Wang G, Tyler KD, Munro CK, Johnson CK, Characterization of Cytotoxic, Hemolytic *Aeromonas caviae* Clinical Isolates and Their Identification by Determining Presence of a Unique Hemolysin Gene. J clin Microbiol. 1996; 34 (12): 3203–3205.

Wei XN, Zheng AJ, Zhang LH, Qu F, Huang X. Sensitive and rapid detection of *Aeromonas caviae* in stool samples by loop-mediated isothermal amplification. Diagnostic Microbiol Infect Dis. 2008; 60: 113-116.

Weldhagen GF. Integrons and beta-lactamases-a novel perspective on resistance. Int J Antimicrob Agents. 2004; 23: 556-562.

Wencewicz TA, Möllmann U, Longa TE, Miller MJ. Is drug release necessary for antimicrobial activity of siderophore-drug conjugates? Syntheses and biological studies of the naturally occurring salmycin “Trojan Horse” antibiotics and synthetic desferridanoxamine-antibiotic conjugates. Biometals. 2009; 22(4): 633-648.

Ye Y, Xu XH, Li JB. Emergence of CTX-M-3, TEM-1, and a new plasmid-mediated MOX-4 AmpC in a multiresistant *Aeromonas caviae* isolated from a patient with pneumonia. J Medical Microbiol. Papers in Press 2010.

Yáñez MA, Catalá V, Apráiz D, Figueras MJ, Murcia JM. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53: 875–883.

Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. J Antimicrob Chemother. 2005; 56(6): 1148-1151.

Zwenger AR e Gillock ET. Bacteria isolated from sewage influent resistant to ciprofloxacin, chloramphenicol and tetracycline. J Environm Science Health. 2009; 44: 123-129.