

CAROLINA HELENA DE OLIVEIRA

Caracterização de estirpes de *Aeromonas* spp. isoladas de peixes ornamentais: identificação de espécies, genes de virulência e perfil de resistência à antimicrobianos

São Paulo

2022

CAROLINA HELENA DE OLIVEIRA

Caracterização de estirpes de *Aeromonas* spp. isoladas de peixes ornamentais: identificação de espécies, genes de virulência e perfil de resistência à antimicrobianos

VERSÃO CORRIGIDA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Departamento de Medicina Veterinária preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian

Coorientadora:

Profa. Dra. Luisa Zanolli Moreno

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4248
FMVZ

Oliveira, Carolina Helena de

Caracterização de estirpes de *Aeromonas* spp. isoladas de peixes ornamentais: identificação de espécies, genes de virulência e perfil de resistência à antimicrobianos / Carolina Helena de Oliveira. – 2022.
82 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian.

Coorientadora: Profa. Dra. Luisa Zanolli Moreno.

1. *Aeromonas* spp. 2. Peixes ornamentais. 3. PCR. 4. Resistência antimicrobiana.
5. AFLP. I. Título.



CERTIFIED

We certify that the Research "Characterization of Aeromonas spp. isolated from ornamental fish: identification of species, virulence genes and antimicrobial resistance profile.", protocol number CEUAX 6065110518 (ID 000997), under the responsibility Simone De Carvalho Balian, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day September 19, 2018.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Caracterização de estirpes de Aeromonas spp. isoladas de peixes ornamentais: identificação de espécies, genes de virulência e perfil de resistência à antimicrobianos.", protocolado sob o CEUAX nº 6065110518, sob a responsabilidade de Simone De Carvalho Balian, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 19 de setembro de 2018.

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: OLIVEIRA, Carolina Helena de

Título: Caracterização de estirpes de *Aeromonas* spp. isoladas de peixes ornamentais: identificação de espécies, genes de virulência e perfil de resistência à antimicrobianos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Claudia e Waldomiro, por toda sabedoria e amor oferecidos desde minha infância, me proporcionando um lar cheio de aprendizados e alegrias. Seus ensinamentos me trazem coragem para lidar com momentos difíceis.

À minha companheira Juliana, por todo amor, apoio e momentos felizes que temos vivido ao longo desses anos. Seu carinho tem tornando meus dias mais leves e cheios de esperança, sem você eu não teria chegado até aqui.

À prof^a Simone de Carvalho Balian por ser minha orientadora, tendo me acolhido com sua doçura e paciência, fazendo com que esses anos de doutorado fossem vistos como uma oportunidade de autoconhecimento e muita sabedoria. Suas palavras tocam nossos corações.

À prof^a Andrea Micke Moreno por ter me apresentado para minha orientadora e por ter me proporcionado muitos momentos de aprendizado e alegrias junto ao laboratório de Sanidade Suína. Seu zelo e cordialidade nos torna uma grande família, levarei para sempre os momentos compartilhados.

À prof^a Luisa Zanolli Moreno por ter acreditado em mim, dedicando longas horas dos seus dias a ensinamentos que irei carregar comigo para sempre. Sua sabedoria e solicitude merecem todo reconhecimento e carinho, sem você eu não teria conseguido.

À todos que de alguma maneira se tornaram presente em minha vida e me dedicaram seus ensinamentos, meus sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) sob nº142055/2018-2.

RESUMO

OLIVEIRA, CH. **Caracterização de estirpes de *Aeromonas* spp. isoladas de peixes ornamentais: identificação de espécies, genes de virulência e perfil de resistência à antimicrobianos.** 2022. 82 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar estirpes de *Aeromonas* spp. previamente isoladas de peixes ornamentais de diferentes espécies apresentando distintos sinais clínicos. Foram avaliadas 300 estirpes isoladas de 123 peixes de 32 espécies; estes apresentavam septicemia, lesão de pele e/ou lesão ocular. A identificação das espécies do gênero *Aeromonas* foi realizada pela técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF e confirmada pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). Dentre as estirpes avaliadas, 53,0% foram identificadas como *A. veronii*, 41,3% como *A. hydrophila*, e 5,7% restante como *A. caviae*. Não foi detectada diferença significativa entre as técnicas de MALDI-TOF MS e PCR para a identificação das espécies de *Aeromonas*, que apresentaram ainda boa concordância. No entanto, também foi constatado que a espectrometria de massa suscita dúvida para adequada atribuição de espécie dentro do gênero *Aeromonas*. Foi observado que 30,9% dos peixes estudados estavam infectados simultaneamente por duas espécies de *Aeromonas*, com predomínio de *A. veronii* e *A. hydrophila*. Em relação aos seis genes de virulência pesquisados nas estirpes de *Aeromonas*, o gene *act* foi detectado em 271 (90,3%) estirpes, *aer* em 238 (79,3%), *fla* em 175 (58,3%), *hlyA* em 131 (43,7%), *alt* em 130 (43,3%), e o gene *ast* em 106 (35,3%). A espécie *A. hydrophila* apresentou mais de 50% de suas estirpes positivas para os genes estudados, enquanto as estirpes de *A. veronii* apresentaram maior proporção de *aer*, *act* e *fla*; já dentre as 17 estirpes de *A. caviae* houve predomínio dos genes *hlyA* e *fla*. Foram identificados 30 perfis de virulência considerando a combinação dos resultados das PCRs, sendo que os cinco principais perfis contêm 227 estirpes (75,7%) (V1 a V5). Apenas cinco (1,7%) estirpes foram negativas para todos os genes (V10), sendo estas identificadas como *A. caviae* e *A. veronii*; enquanto 31 estirpes (10,3%) foram positivas para todos os genes (V4) das quais 30

são *A. hydrophila*. Em relação à caracterização do perfil de resistência aos antimicrobianos, esta foi realizada para apenas 234 estirpes (78,0%). Dentre os 16 antimicrobianos avaliados, sulfonamida e sulfametoxazol-tripmetropim apresentaram mais de 50% de taxa de resistência. Já eritromicina, imipenem e ciprofloxacina apresentaram mais de 38,0% das estirpes com resultado intermediário. Susceptibilidade foi observada principalmente para as cefalosporinas, os aminoglicosídeos, o clorafenicol e piperacilina-tazobactam. Multirresistência foi detectada em 82,5% das estirpes estudadas, destacando-se as estirpes de *A. caviae* com 100% de multirresistência e *A. hydrophila* com 90,9%. A análise de SE-AFLP resultou em 66 genótipos de *A. hydrophila*, 118 de *A. veronii*, e 14 de *A. caviae*, evidenciando maior heterogeneidade das espécies *A. veronii* e *A. caviae* comparadas a *A. hydrophila*. No entanto, não foi observada correlação direta entre os genótipos e a origem das estirpes ou perfil de virulência.

Palavras-chave: *Aeromonas* spp.; Peixes ornamentais; PCR; Resistência antimicrobiana; AFLP.

ABSTRACT

OLIVEIRA, CH. **Characterization of strains of *Aeromonas* spp. isolated from ornamental fish: species identification, virulence genes and antimicrobial resistance profile.** [Caracterização de estirpes de *Aeromonas* spp. isoladas de peixes ornamentais: identificação de espécies, genes de virulência e perfil de resistência à antimicrobianos]. 2022. 82 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The objective of this study was to characterize *Aeromonas* spp. strains previously isolated from ornamental fish of different species showing distinct clinical signs. We evaluated 300 strains isolated from 123 fish of 32 species; these presented septicaemia, skin lesion and/or eye lesions. The species identification of the *Aeromonas* genus was performed by the MALDI-TOF mass spectrometry technique and confirmed by polymerase chain reaction (PCR). Among the evaluated strains, 53.0% were identified as *A. veronii*, 41.3% as *A. hydrophila*, and 5.7% remaining as *A. caviae*. No significant difference was detected between MALDI-TOF MS and PCR techniques for the identification of *Aeromonas* species, which still presented good concordance. However, it was also found that mass spectrometry raises doubts for proper species assignment within the *Aeromonas* genus. It was observed that 30.9% of the studied fish were infected simultaneously by two *Aeromonas* species, with predominance of *A. veronii* and *A. hydrophila*. Regarding the six virulence genes investigated in the *Aeromonas* strains, the *act* gene was detected in 271 (90.3%) strains, *aer* in 238 (79.3%), *fla* in 175 (58.3%), *hlyA* in 131 (43.7%), *alt* in 130 (43.3%), and the *ast* gene in 106 (35.3%). More than 50% of *A. hydrophila* strains were positive for all the studied genes, while the *A. veronii* strains presented a higher proportion of *aer*, *act* and *fla*; among the 17 *A. caviae* strains there was a predominance of the *hlyA* and *fla* genes. 30 virulence profiles were identified, taking into account the PCRs results, with the five main profiles identified comprising 227 strains (75%) (V1 to V5). Only five (1.7%) strains were negative for all genes (V10) identified as *A. caviae* and *A. veronii*; while 31 strains (10.3%) were positive for all genes (V4) of which 30 are *A. hydrophila*. Regarding the antimicrobial's susceptibility profile, this was performed for only 234 strains (78.0%). Among the 16 antimicrobials

evaluated sulfonamide sulfamethoxazole-trimethopim showed more than 50% of resistance rate. Erythromycin, imipenem and ciprofloxacin presented more than 38.0% of the strains with an intermediate result. Susceptibility was observed mainly for cephalosporins, aminoglycosides, chlorphenicol and piperacillin-tazobactam. Multiresistance was detected in 82.5% of the studied strains, highlighting the *A. caviae* strains with 100% of multiresistance and *A. hydrophila* with 90.9%. The SE-AFLP analysis resulted in 66 genotypes of *A. hydrophila*, 118 of *A. veronii*, and 14 of *A. caviae*, evidencing greater heterogeneity of the species *A. veronii* and *A. caviae* compared to *A. hydrophila*. However, no direct correlation was observed between the genotypes and the origin of the strains or virulence profile.

Keywords: *Aeromonas* spp.; Ornamental fish; PCR; Antimicrobial resistance; AFLP.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Identificação das espécies de <i>Aeromonas</i> pelas técnicas MALDI-TOF MS e PCR – N (%)..... | 44 |
| Tabela 2: Distribuição dos perfis de infecção das espécies de <i>Aeromonas</i> de acordo com os animais estudados..... | 45 |
| Tabela 3: Distribuição de frequência das espécies de <i>Aeromonas</i> identificadas segundo as espécies de peixes estudadas – N (%)..... | 46 |
| Tabela 4: Distribuição de frequência das espécies de <i>Aeromonas</i> identificadas segundo as afecções observadas – N (%)..... | 47 |
| Tabela 5: Distribuição de frequência das espécies de <i>Aeromonas</i> identificadas segundo o sítio de isolamento..... | 47 |
| Tabela 6: Distribuição de frequência das espécies de <i>Aeromonas</i> identificadas segundo o fenótipo de hemólise..... | 48 |
| Tabela 7: Distribuição de frequência dos perfis de virulência identificados segundo a espécie de <i>Aeromonas</i> | 52 |
| Tabela 8: Distribuição de frequência dos perfis de resistência identificados – N (%)..... | 59 |
| Tabela 9: Distribuição de frequência dos perfis de resistência identificados – N (%)..... | 59 |
| Tabela 10: Distribuição de frequência do número de classes de antimicrobianos resistentes segundo as espécies de <i>Aeromonas</i> – N (%)..... | 60 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1: Iniciadores e respectivos tamanhos dos produtos de amplificação para a identificação das espécies e genes de virulência de <i>Aeromonas</i> | 37 |
| Quadro 2: Iniciadores utilizados para detecção de diferentes genes codificadores de fatores de virulência de <i>Aeromonas</i> | 39 |
| Quadro 3: Antimicrobianos avaliados e respectivas concentrações e pontos de corte utilizados. | 41 |
| Quadro 4: Antimicrobianos avaliados considerando ECOFF..... | 41 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Gráfico representativo da distribuição dos genes de virulência detectados segundo as espécies de <i>Aeromonas</i> | 49 |
| Figura 2: Gráfico representativo da distribuição dos genes de virulência detectados segundo o fenótipo de alfa- e beta-hemólise..... | 50 |
| Figura 3: Gráfico representativo da distribuição dos genes de virulência detectados segundo os quadros clínicos observados..... | 50 |
| Figura 4: Gráfico representativo da distribuição dos principais perfis de virulência identificados segundo as espécies de <i>Aeromonas</i> | 51 |
| Figura 5: Dendrograma dos perfis de virulência identificados para as estirpes estudadas (Parte 1)..... | 53 |
| Figura 6: Dendrograma dos perfis de virulência identificados para as estirpes estudadas. (Parte 2)..... | 54 |
| Figura 7: Dendrograma dos perfis genéticos de SE-AFLP identificados para as estirpes de <i>A. hydrophila</i> | 55 |
| Figura 8: Dendrograma dos perfis genéticos de SE-AFLP identificados para as estirpes de <i>A. veronii</i> | 57 |
| Figura 9: Dendrograma dos perfis genéticos de SE-AFLP identificados para as estirpes de <i>A. caviae</i> | 58 |
| Figura 10: Gráfico representativo da distribuição dos resultados de antibiograma observados segundo as espécies de <i>Aeromonas</i> | 61 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 16 |
| 2.1 Gênero <i>Aeromonas</i> | 16 |
| 2.2 Taxonomia e métodos de identificação..... | 17 |
| 2.3 Epidemiologia..... | 19 |
| 2.4 Infecções em peixes..... | 20 |
| 2.5 Infecções em humanos..... | 23 |
| 2.6 Fatores de virulência..... | 25 |
| 2.7 Caracterização genotípica..... | 28 |
| 2.8 Resistência antimicrobiana | 29 |
| 3. OBJETIVOS | 32 |
| 3.1 Objetivo Geral | 32 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 32 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 4.1 Origem das estirpes bacterianas | 33 |
| 4.2 Bacteriológico..... | 33 |
| 4.3 Identificação das estirpes por espectrometria de massa MALDI-TOF | 34 |
| 4.4 Caracterização genotípica..... | 35 |
| 4.4.1 Extração do DNA | 35 |
| 4.4.2 Identificação genotípica das espécies | 35 |
| 4.4.3 Pesquisa de genes de virulência de <i>Aeromonas</i> | 37 |
| 4.4.4 Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (SE-AFLP)..... | 39 |
| 4.5 Perfil de resistência aos antimicrobianos..... | 40 |
| 4.6 Análise dos resultados | 42 |
| 5. RESULTADOS..... | 43 |
| 6. DISCUSSÃO | 62 |
| 7. CONCLUSÕES | 73 |
| REFERÊNCIAS | 75 |

1. INTRODUÇÃO

Os benefícios sociais e econômicos oferecidos pelo segmento aquícola da indústria *pet* são marcantes no Brasil considerando a população de 20,8 milhões de peixes ornamentais (ABINPET, 2022). Entretanto, potenciais patógenos como bactérias, fungos, vírus e parasitas podem ser disseminados, sendo capazes de causar doença tanto nos animais comercializados como em seus manipuladores (SMITH et al., 2012; ANJUR et al., 2021).

Nas últimas duas décadas a expansão da aquicultura proporcionou um entendimento satisfatório sobre a patogênese das doenças bacterianas em peixes. Contudo, ainda é considerado ínfimo quando comparado ao conhecimento sobre as doenças bacterianas em outros animais e humanas (BARKER, 2001).

Altos níveis de morbidade e mortalidade provocados por infecções bacterianas podem ser encontrados em peixes cultivados (BARKER, 2001), sendo considerado um sério problema para a indústria de peixes ornamentais (ANJUR et al., 2021). Além disso, essas bactérias também estão presentes na microbiota dos peixes e na água, sendo caracterizadas como patógenos oportunistas (LEIRA et al., 2016).

Dentre esses patógenos destaca-se o gênero *Aeromonas*, composto por 36 espécies, sendo *A. hydrophila*, *A. veronii* e *A. caviae* as mais descritas em processos infecciosos (LORÉN; FARFÁN; FUSTÉ, 2018; FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). As bactérias do gênero *Aeromonas* são comumente encontradas em ambientes aquáticos, podendo também ser isoladas de diversas espécies animais, alimentos e solo (JANDA; ABBOTT, 2010).

O presente estudo teve como objetivo caracterizar estirpes de *Aeromonas* spp. isoladas de diferentes espécies de peixes ornamentais que apresentavam distintos sinais clínicos. Para tanto, foi realizada a identificação molecular das espécies de *Aeromonas* e detecção de genes de virulência, além da determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos. Os resultados do presente estudo permitirão ampliar o conhecimento sobre o potencial de virulência e sobre o perfil de resistência das estirpes de *Aeromonas* spp. e ainda explorar o potencial zoonótico deste agente para os profissionais, criadores e proprietários que manipulam os peixes diariamente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Aeromonas*

As bactérias do gênero *Aeromonas* pertencem à família *Aeromonadaceae*, apresentam habilidade de formar biofilme e são encontradas comumente em ambientes aquáticos (CHAURET et al., 2001; ALMEIDA, 2015).

Os membros desse gênero ocorrem de forma isolada e raramente em pares ou em cadeias curtas, sendo compostos por bacilos Gram-negativos cujo tamanho varia entre 0,3 - 1,0 μm X 1,0 - 3,5 μm . Trata-se de bactérias anaeróbias facultativas, não produtoras de esporos, produtoras de catalase, fermentadoras de glicose e capazes de transformar nitrato em nitrito (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005). Além disso, o gênero é caracterizado pela produção da enzima citocromo oxidase que permite diferenciá-las das *Enterobacteriaceae* e de indol, além de serem capazes de fermentar maltose, D-galactose e trealose. Semeadas em ágar

sangue, normalmente, são beta-hemolíticas (EDBERG; BROWNE; ALLEN, 2007; PARKER; SHAW, 2011).

O gênero *Aeromonas* é classificado como mesófilo, sendo que a maioria das espécies é capaz de se multiplicar em uma amplitude de temperatura de 5°C a 41°C, com exceção de *A. salmonicida* cuja temperatura ótima de crescimento apresenta uma variação entre 22°C e 28°C (POPOFF, 1984). As espécies de *Aeromonas* também são caracterizadas como halotolerantes estando aptas a crescerem em concentrações de NaCl de 2% a 4% (BUCHANAN; PALUMBO, 1985; FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

2.2 Taxonomia e métodos de identificação

Ao longo das últimas décadas a taxonomia do gênero *Aeromonas* sofreu mudanças em decorrência do uso de técnicas moleculares, demonstrando discordâncias consideráveis entre identificações fenotípicas e genotípicas (BEAZ-HIDALGO et al., 2010). A partir de 1992, 22 novas espécies foram descritas e incluídas no gênero (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

Segundo a última edição do *Bergey's Manual*, as bactérias do gênero *Aeromonas*, anteriormente alocadas na família *Vibrionaceae*, pertencem à ordem *Aeromonadales* composta pela família *Aeromonadaceae* (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005; EDBERG; BROWNE; ALLEN, 2007).

Dois grandes grupos de espécies podem ser diferenciados dentro do gênero *Aeromonas* baseando-se nas características de motilidade e temperatura de multiplicação (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005). O grupo mesofílico e móvel, cuja temperatura de desenvolvimento é entre 35 a 37°C, é composto pelas espécies

A. hydrophila, *A. caviae* e *A. sobria*. Já o grupo de espécies imóveis e psicrófilas apresenta temperatura ótima de crescimento entre 22 e 25°C e tem como representantes *A. salmonicida* e *A. media* (POPOFF, 1984; HOLMES; NICCOLLS; SARTORY, 1996; JANDA; ABBOTT, 2010).

Nas últimas duas décadas, o gênero *Aeromonas* passou por uma extensa revisão na nomenclatura e taxonomia a partir da evolução dos métodos de filogenia molecular. Atualmente são descritas 36 espécies no gênero, apesar de ainda existir controversa sobre as melhores técnicas para a identificação e taxonomia final deste (LORÉN; FARFÁN; FUSTÉ, 2018; FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

Além disso, também são descritos no gênero alguns complexos de espécies, como *A. hydrophila* (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005), *A. veronii* (SILVER et al., 2011) e *A. media* (TALAGRAND-REBOUL et al., 2017), sendo estes constituídos por grupos de estirpes com heterogeneidade intraespecífica, mas que ainda não definiram novas espécies (LORÉN; FARFÁN; FUSTÉ, 2018).

Em análises filogenéticas e taxonômicas, tradicionalmente emprega-se o sequenciamento do gene 16S rDNA; entretanto, as bactérias do gênero *Aeromonas* apresentam pouca heterogeneidade entre os *operons rrm* e alta similaridade das sequências entre espécies intimamente relacionadas, tornando a diferenciação de espécies a partir do sequenciamento do gene 16S rDNA pouco confiável (MORANDI et al, 2005; JANDA; ABBOTT, 2007; FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

Dessa forma, a correta identificação dessas bactérias ao nível de espécie usando métodos fenotípicos e genotípicos ainda é um desafio para a maioria dos laboratórios de microbiologia clínica (FIGUERAS, 2005). Os melhores resultados para diferenciação genotípica das espécies foram descritos com o sequenciamento

de genes *housekeeping*, como *rpoB*, *rpoD* e *gyrB* (SOLER et al., 2004; LAMY; LAURENT; KODJO, 2010).

Recentemente, a utilização da espectrometria de massa (MALDI-TOF) foi considerada uma técnica alternativa para identificação das estirpes do gênero (LAMY; KODJO; LAURENT, 2011). Entretanto, essa técnica detecta proteínas relacionados ao gene 16S rDNA podendo apresentar pouca diferenciação entre as espécies do gênero *Aeromonas* (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

2.3 Epidemiologia

Com distribuição universal, as bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas* podem ser isoladas de praticamente todos os ambientes em que existam ecossistemas bacterianos (JANDA; ABBOTT, 2010). Estas podem ser encontradas também como bactérias de vida livre ou associadas a crustáceos na camada superficial dos oceanos (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005; JANDA; ABBOTT, 2010).

Consideradas autóctones de ambientes aquáticos, as bactérias do gênero *Aeromonas* já foram isoladas de rios, lagos, mar, esgotos, fontes de água mineral (HOLMES; NICCOLLS; SARTORY, 1996) e água clorada (EDBERG; BROWNE; ALLEN, 2007). Os estuários, por apresentarem concentrações de salinidade mais baixas que as regiões bentônicas, tornam-se um ambiente ideal para crescimento de *Aeromonas* (JANDA; ABBOTT, 2010).

Dessa forma, a água é considerada como o principal meio de disseminação de *Aeromonas*. A infecção pode ocorrer de forma direta, através do contato direto ou da própria ingestão da água contaminada, ou de forma indireta a partir de alimento,

seja este peixe e/ou fruto do mar além de demais produtos que possam ter sido contaminados com a água (TAVARES; CERESER; TIMM, 2015).

Além disso, a constante interação e exposição entre essas bactérias e os humanos possibilitam o seu isolamento de outros ambientes e alimentos, incluindo animais domésticos, aves, animais invertebrados e solo (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005; JANDA; ABBOTT, 2010).

Tradicionalmente, alguns fatores como a adição de cloreto de sódio, baixas temperaturas e pH, inibem o crescimento de muitas bactérias em alimentos. No entanto, as espécies do gênero *Aeromonas* podem sobreviver em temperaturas baixas (2 – 10°C), em pH de 5 e em concentrações de cloreto de sódio de até 4% (BUCHANAN; PALUMBO, 1985; FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). Dessa forma, essas bactérias podem sobreviver e persistir em vários tipos de alimentos e ambientes.

O gênero *Aeromonas* também já foi detectado em esgoto. A incidência de *Aeromonas* em água de esgoto tem se mostrado alta e as metodologias convencionais de tratamento desses efluentes não possuem bons resultados na eliminação dessas bactérias. Entretanto, protocolos com adição de ozônio e/ou radiação ultravioleta eliminam por completo esses agentes (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

2.4 Infecções em peixes

A indústria da aquicultura se desenvolveu rapidamente nas últimas décadas e a indústria de peixes ornamentais contribuiu com esse crescimento (ANJUR et al., 2021). Os peixes ornamentais são valorizados pela sua beleza e colorações

distintas; porém a alta demanda por esses animais faz com que a sua comercialização esteja em constante crescimento. Em contrapartida a intensificação da criação de peixes ornamentais, ocorre o aumento de doenças infecciosas associado à mortalidade de peixes e grandes perdas econômicas (ANJUR et al., 2021).

As bactérias dos gêneros *Aeromonas* e *Vibrio*, ambas habitantes de ambientes aquáticos e peixes saudáveis, podem se assumir patogênicas para peixes ornamentais e ocasionarem perdas significativas em situações de estresse (SMITH et al., 2012; CARDOSO et al., 2021). O gênero *Aeromonas* faz parte da microbiota intestinal dos peixes; no entanto, esta microbiota pode ser alterada durante os estágios iniciais de desenvolvimento por modificações na dieta e nas condições ambientais (HOVDA et al., 2007).

Fatores como temperatura, manejo, condições nutricionais e disponibilidade de oxigênio, podem ocasionar o desequilíbrio das microbiotas e predispor os peixes a diferentes enfermidades (MORAES; MARTINS, 2004).

O estresse no ambiente aquático, ocasionado por fatores como alterações na qualidade da água associada à elevada densidade de estocagem de peixes, tem relação direta com o surgimento de doença em peixes (ROBERTS, 2012; LEIRA et al., 2016; CARDOSO et al., 2021).

Frente à ações que promovam o estresse, seja de forma aguda ou crônica, ocorre um desequilíbrio homeostático no organismo do peixe, levando ao aumento da concentração plasmática de cortisol. Esse aumento na concentração plasmática de cortisol irá agir principalmente na supressão da resposta imune desses animais (LIMA et al., 2006).

A atenção mundial sobre os membros do gênero *Aeromonas* aumentou consideravelmente nos últimos anos, em decorrência das taxas significativas de mortalidade provocadas nos peixes e das conseqüentes perdas econômicas durante os surtos (LAZADO; ZILBERG, 2018; HOSSAIN; HEO, 2021).

Para os peixes criados em viveiros ou em sistemas com recirculação de água, os integrantes do grupo de *Aeromonas* móveis são os principais patógenos associados com o desenvolvimento de doenças (JOHN; HATHA, 2013; HOSSAIN; HEO, 2021). Do gênero *Aeromonas*, destacam-se as espécies mesófilas, principalmente *A. hydrophila* que já foi correlacionada com alta mortalidade em diversas espécies de peixes ocasionando perdas econômicas ao redor do mundo (JANDA; ABBOTT, 2010).

A aeromonose em peixes é transmitida horizontalmente a partir das excretas ou lesões de pele, podendo levar à morte entre dois e dez dias após o aparecimento dos sinais clínicos (LEIRA et al., 2016). Lesões ou úlceras são importantes áreas para adesão e colonização bacteriana, assim como as brânquias, pele e trato gastrointestinal (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013). As espécies de *Aeromonas* podem ser consideradas agentes primários ou oportunistas causando infecções em peixes e humanos imunossuprimidos (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005; JANDA; ABBOTT, 2010).

A infecção por *Aeromonas* em peixes pode ocasionar quadros de septicemia hemorrágica e síndrome da doença ulcerativa e pode acometer qualquer espécie de peixe; os surtos podem ocasionar perdas econômicas importantes no setor da aquicultura, tanto em peixes de águas doces ou salgadas, cultivados ou selvagens (MORAES; MARTINS, 2004; BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013). O quadro clínico de hemorragia cutânea progredindo para ulcerações com perda de epitélio é

comumente associado a infecções ocasionadas por *A. hydrophila* (LEIRA et al., 2016).

Apesar da infecção por *Aeromonas* ser considerada comum, o mecanismo de patogenicidade do gênero é complexo e ainda não foi totalmente esclarecido, sendo que a doença é classificada como multifatorial (CHOPRA; HOUSTON, 1999; BIZANI; BRANDELLI, 2001). Os quadros com sintomatologia nervosa e septicemia são semelhantes aos apresentados em infecções ocasionadas por *Streptococcus* spp. sendo muito importante o diagnóstico diferencial nesses casos (FIGUEIREDO et al., 2008).

2.5 Infecções em humanos

O gênero *Aeromonas* é conhecido como agente causador de uma variedade de infecções em humanos, como gastroenterite, infecções cutâneas e do trato respiratório, além de septicemia, meningite, endocardite e infecções urinárias (BIZANI; BRANDELLI, 2001; GUERRA et al., 2007; PARKER; SHAW, 2011). Infecções nosocomiais estão mais relacionadas a procedimentos cirúrgicos (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

Classicamente, indivíduos suscetíveis adquirem a bactéria a partir do consumo ou contato direto com água e alimentos contaminados. A maioria das infecções clínicas está associada às espécies *A. hydrophila*, *A. veronii*, e *A. caviae* (FIGUEIREDO et al., 2008; PEIXOTO et al., 2012; FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). As bactérias do gênero *Aeromonas* são responsáveis por uma ampla variedade de complicações infecciosas tanto em indivíduos

imunocompetentes como em imunocomprometidos, independentemente da idade (CHOPRA; HOUSTON, 1999; JANDA; ABBOTT, 2010).

A gastroenterite é o quadro mais comum e em casos graves pode ocorrer peritonite, colite e colangite. As espécies habitualmente identificadas são *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar *sobria*, que representam 85% dos casos de gastroenterite infecciosa. As espécies *A. caviae* e *A. veronii* biovar *sobria* também são comumente associadas ao quadro de “diarreia do viajante” (GUERRA et al., 2007; PARKER; SHAW, 2011; TOMÁS, 2012). As infecções por *Aeromonas* spp. associadas a gastroenterite são mais frequentes durante os meses mais quentes do ano devido ao aumento na concentração de bactérias na água (BURKE et al., 1984).

O segundo tipo de infecção por *Aeromonas* spp. mais frequente em humanos são as infecções em feridas cutâneas que geralmente surgem em indivíduos saudáveis após a contaminação das lesões por abrasão nos ambientes aquáticos e solo contaminado. Tais feridas incluem celulite, mionecrose e ectima, que podem evoluir para osteomielite bem como vários casos de gangrena (PARKER; SHAW, 2011). Já em pacientes imunocomprometidos, as lesões de feridas normalmente evoluem para casos de fasciíte necrosante (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

Em relação às infecções septicêmicas causadas por *Aeromonas* spp. estas estão principalmente associadas a pacientes imunocomprometidos. Em casos raros pode acometer indivíduos saudáveis após o aparecimento de infecções severas de feridas. Os sintomas nesses casos incluem diarreia, febre, arrepios e dores abdominais. Septicemias que se desenvolvem em pacientes com infecções graves de feridas apresentam taxas de mortalidade de até 90% (JANDA; ABBOTT, 2010; PARKER; SHAW, 2011).

2.6 Fatores de virulência

Para que uma infecção se desenvolva é preciso que o agente bacteriano, através de fatores de virulência, seja capaz de aderir ou invadir as células do hospedeiro, escapando dos mecanismos de defesa desse (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013). Em hospedeiros suscetíveis, as bactérias patogênicas irão produzir danos celulares através da ação de múltiplos fatores de virulência que podem estar presentes isoladamente ou em conjunto (EL-BAHAR et al., 2019).

Espécies de *Aeromonas* com potencial patogênico podem ser encontradas em peixes saudáveis ou enfermos. A patogênese das infecções é multifatorial e está relacionada com a interação entre hospedeiro, agente e ambiente (CHOPRA; HOUSTON, 1999; JOHN; HATHA, 2013).

Múltiplos fatores de virulência são carregados pelos integrantes do gênero *Aeromonas* (PEIXOTO et al., 2012; EL-BAHAR et al., 2019). Dentre os fatores de virulência, as espécies de *Aeromonas* podem produzir vários produtos extracelulares como hemolisinas (também denominadas de aerolisinas), citotoxinas, enterotoxinas, proteases, leucocidinas, fosfolipases, lipases, elastases, DNases, adesinas, além de colinesterases (ALPERI; FIGUERAS, 2010; JOHN; HATHA, 2013). Outros fatores de virulência descritos são representados por estruturas associadas às células, incluindo *pili*, flagelos, proteínas de membrana externa, lipopolissacarídeos e cápsula (JANDA, 1991).

Assim como outras bactérias, as *Aeromonas* secretam enzimas e toxinas que irão agir diretamente nas células hospedeiras. Dentre estas, destacam-se as toxinas com ação de citolisinas (aerolisina / hemolisina) e as enterotoxinas (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013). A aerolisina promove alteração da permeabilidade

das células sanguíneas, assim como de outras células eucarióticas, ocasionando lise osmótica. O gene codificador desta toxina é denominado *aer* (EL-BAHAR et al., 2019; PESSOA et al., 2019). Já a hemolisina codificada pelo gene *hlyA*, induz a formação de poros na membrana celular das hemácias provocando hemólise e podendo ocasionar quadros de anemia (EL-BAHAR et al., 2019).

Em relação às enterotoxinas, estas estão relacionadas aos quadros clínicos gastrointestinais e no caso do gênero *Aeromonas* destacam-se as enterotoxinas citotóxicas e citotônicas (PESSOA et al., 2019). A enterotoxina citotóxica, codificada pelo gene *act*, é responsável por promover a degeneração da mucosa intestinal com lesões nas células de vilosidades e produtoras de muco, promovendo uma resposta inflamatória aguda local. Esta é considerada uma das mais potentes toxinas das doenças do trato gastrointestinal, geralmente relacionada com casos de diarreia sanguinolenta em humanos (EL-BAHAR et al., 2019; PESSOA et al., 2019).

As enterotoxinas citotônicas são divididas em dois grupos: as termolábeis que podem ser degradadas a 56°C por 10 minutos, codificadas pelo gene *alt*, e as termoestáveis que podem ser degradadas a 100°C por 30 minutos, codificadas pelo gene *ast* (PESSOA et al., 2019). Essas enterotoxinas não causam danos extensos degenerativos ao epitélio intestinal e estão relacionados a casos de diarreia secretória (PESSOA et al., 2019).

Em relação às estruturas celulares de importância para a patogenicidade, as *Aeromonas* podem apresentar flagelos polares e laterais; o flagelo polar está relacionado com a capacidade de a bactéria apresentar motilidade em ambientes líquidos, enquanto os flagelos laterais são associados à motilidade do tipo *swarming* (enxame) sob superfícies sólidas ou semissólidas. O flagelo polar destaca-se dentre

os fatores de virulência detectados em *Aeromonas* e é composto pela proteína flagelina que é codificada pelo gene *fla* (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

A detecção das estirpes virulentas através de metodologias convencionais torna-se muito demorada e laboriosa; para solucionar esse percalço são pesquisados genes de virulência pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) (EL-BAHAR et al., 2019). Estudos avaliando a frequência dos genes de virulência de *Aeromonas* já foram realizados em vários países considerando diferentes origens de isolamento; no entanto, há grande variação dentre os genes pesquisados (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

Em um estudo realizado com 199 estirpes de *Aeromonas* spp. provenientes de água e bancos de isolados clínicos humanos dos Estados Unidos, foram detectados 11 genes codificadores de fatores de virulência; neste caso foram observados alguns genes presentes tanto nas estirpes de água quanto nas de casos clínicos, indicando assim o potencial de amostras de água em causar doença em humanos (KHAJANCHI et al., 2010).

Khor et al. (2015) avaliaram 102 estirpes de *Aeromonas* spp. da Malásia provenientes de água de lagos; dentre os 12 genes de virulência estudados pelo menos 2 desses genes estavam presentes em todas as estirpes. *A. hydrophila* foi a principal espécie contendo os genes de virulência *alt* e *ast* sugerindo risco para a saúde pública. Os autores também sugerem que as diferentes espécies do gênero *Aeromonas* podem apresentar diferentes mecanismos virulência.

No Brasil, a maioria dos estudos de *Aeromonas* foi realizada com amostras de ambiente, humanos e animais, incluindo peixes não ornamentais. Kim et al. (2019) avaliaram a presença de *Aeromonas* spp. em cultivos de tilápias em tanques-rede no Pernambuco; dentre as 150 estirpes analisadas os genes de virulência mais

frequentes foram *act* e *aer*. Roges et al. (2020) avaliaram 110 estirpes de *A. hydrophila* isoladas de alimentos, amostras clínicas humanas e animais (aves e mamíferos marinhos, quelônios), no Laboratório de Enterobactérias (FIOCRUZ), e observaram que mais de 90% das estirpes apresentaram um dos cinco genes de virulência investigados; os autores também identificaram 20 perfis de virulência diferentes entre as estirpes estudadas.

2.7 Caracterização genotípica

As técnicas moleculares são comumente utilizadas para a diferenciação de estirpes de uma mesma espécie e rastreamento epidemiológico para determinação da origem das estirpes bacterianas e dos respectivos surtos. Além disso, essas metodologias também auxiliam a compreender a dinâmica e a persistência das estirpes bacterianas em diferentes ambientes (PERSING et al., 2004).

Diferentes técnicas moleculares já foram aplicadas ao estudo do gênero *Aeromonas*, incluindo: análise de sequências palindrômicas extragênicas repetidas (REP-PCR), polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP), sequências consenso intergênicas repetitivas enterobacterianas (ERIC-PCR), polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), eletroforese em gel de agarose em campo pulsado (PFGE) e tipagem de sequências *multilocus* (MLST) (HUYS et al., 1994; 1996; SORIANO et al., 1997; SZCZUKA; KAZNOWSKI, 2004; BARRETT; - SMIDT; SWAMINATHAN, 2006; PABLOS et al., 2011; FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). No entanto, a maioria desses métodos são considerados muito trabalhosos e demorados, e que muitas vezes não fornecem resultados discriminatórios (MARTINO et al., 2011).

A técnica de AFLP se destaca dentre as demais, por requerer menos tempo que a PFGE e produzir melhores resultados que REP e ERIC-PCR. O método utilizando dupla restrição enzimática já foi descrito com sucesso para a caracterização de espécies de *Aeromonas*. Janssen et al. (1996) e Huys et al. (1996a, 1996b) demonstraram a habilidade da técnica de AFLP para diferenciação das espécies de *Aeromonas* de forma a auxiliar na taxonomia do gênero.

Além disso, a técnica AFLP também é de grande valia para estudos de epidemiologia molecular e rastreamento epidemiológico. Lund et al. (2002) utilizaram a técnica AFLP para avaliar a variabilidade genética e parentesco de estirpes de *A. salmonicida* originárias de peixes marinhos; os autores observaram que os agrupamentos de perfis genéticos indicavam uma relação entre a similaridade genética dos isolados e a espécie do hospedeiro. Pablos et al. (2011) também utilizaram a técnica AFLP para avaliar uma coleção espanhola de estirpes de *Aeromonas* isoladas de pacientes com diarreia, água potável e alimentos e observaram uma relação clonal entre estirpes de água e isolados humanos; os resultados obtidos indicaram a transmissão de *A. caviae* por água contaminada ocasionando doença em humanos.

2.8 Resistência antimicrobiana

Em relação à resistência aos antimicrobianos, sabe-se que algumas espécies de *Aeromonas* são resistentes aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos devido à produção de β -lactamases (JANDA; ABBOTT, 2010). Em geral, a maioria das estirpes é susceptível aos aminoglicosídeos, cefalosporinas, tetraciclinas, cloranfenicol, quinolonas e sulfonamidas (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005). As

quinolonas se destacam, neste contexto, por ser uma classe antimicrobiana muito utilizada para o controle de enfermidades em peixes e que podem persistir por um longo período no ambiente (GUO et al. 2014).

Relatada como uma questão atual e mundial de saúde pública, a resistência aos antimicrobianos ocorre de maneira natural. Porém o uso de terapias antimicrobianas ineficazes ou inadequadas e a regulamentação exígua sobre o uso de tais substâncias, tem tornado o aparecimento de bactérias resistente cada vez mais comum (BRASIL, 2017).

Em países de baixa renda onde o saneamento básico é quase inexistente e más práticas de higiene são exercidas, há maiores relatos de resistência aos antimicrobianos visto que a água é um importante veículo de disseminação bacteriana e as bactérias estão em constante interação com troca de genes de virulência e resistência (ALEEM et al., 2021). Além disso, efluentes hospitalares possuem grande quantidade de resíduos antimicrobianos e bactérias resistentes contribuindo para o agravamento da resistência aos antimicrobianos (ALEEM et al., 2021).

No Brasil, apenas duas moléculas são autorizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) na piscicultura, o florfenicol e a oxitetraciclina (SINDAN, 2018). Esta limitação, no entanto, favorece o uso irregular de outros antimicrobianos, sejam estes licenciados para outros animais ou até mesmo para humanos, causando prejuízos tanto para a saúde animal quanto para o meio ambiente e a saúde humana (SILVA, 2020).

O uso indiscriminado de antibióticos na aquicultura induz a seleção de bactérias com características de multirresistência, ou seja, resistentes às várias classes de antimicrobianos concomitantemente (PEIXOTO et al., 2012; JOHN;

HATHA, 2013; HOSSAIN; HEO, 2021). Os genes de resistência aos antimicrobianos, codificadores do fenótipo de resistência, podem ainda ser transferidos ou obtidos de outras bactérias, de forma a se disseminar entre os microrganismos e diferentes ambientes (JOHN; HATHA, 2013).

Em um estudo com estirpes de *Aeromonas* isoladas de três lagos de carpas contendo adultos e alevinos na cidade de Wiklino, na Polônia, Zdanowicz et al. (2020) constataram que tais isolados apresentaram resistência aos antimicrobianos das classes dos β -lactâmicos e lincosamidas, e demonstraram sensibilidade aos aminoglicosídeos, cloranfenicol e fluoroquinolonas.

Em outro estudo realizado com 57 estirpes de *Aeromonas* isoladas de alimentos (frango fresco e congelado, aves de caça, leite pasteurizado, alimentos para bebês, produtos de panificação, frutas, legumes, peixes e água) provenientes da cidade Abu Dhabi, nos Emirados Árabes Unidos, foi detectada resistência a penicilinas, sulfametoxazol, trimetoprina e macrolídeos, e sensibilidade a tetraciclina, cloranfenicol, nitrofurantoína, aminoglicosídeos, cefalosporinas, quinolonas, sulfato de colistina e sulfatrimetropina (AWAN et al., 2009).

No Brasil, Guerra et al. (2007) detectaram *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* em pacientes com gastroenterite de dois hospitais no Rio Grande do Sul; os autores observaram que todos os isolados de *Aeromonas* eram resistentes a ampicilina, ticarcilina/ácido clavulânico, cefalotina e cefazolina, e enquanto os antibióticos mais eficientes foram as quinolonas e os aminoglicosídeos. Já no estudo de Roges et al. (2020), mais de 50% das estirpes de *A. hydrophila* foram suscetíveis aos 11 antibióticos testados; no entanto, foram identificados 21 perfis de resistência diferentes com apenas 6,4% de multirresistência.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar estirpes de *Aeromonas* spp. isoladas de peixes ornamentais por meio da identificação molecular das espécies e dos genes de virulência, além da determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos.

3.2 Objetivos Específicos

1. Identificar as estirpes suspeitas de *Aeromonas* spp. pela técnica de MALDI-TOF MS;
2. Confirmar a identificação das estirpes suspeitas de *Aeromonas* spp. pela técnica de PCR;
3. Detectar os genes de virulência nas estirpes de *Aeromonas* pela técnica de PCR;
4. Avaliar a variabilidade genética das estirpes através da análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (SE-AFLP);
5. Caracterizar o perfil de resistência aos antimicrobianos das estirpes de *Aeromonas* pela técnica de disco-difusão;
6. Analisar os dados obtidos através da caracterização fenotípica e genotípica das estirpes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem das estirpes bacterianas

Foram avaliadas 300 estirpes de *Aeromonas* spp. isoladas de 123 peixes ornamentais de 32 diferentes espécies. Desses animais, 72 foram avaliados na tese de Doutorado do Médico Veterinário Pedro Henrique Magalhães Cardoso na qual também foram realizados os isolamentos bacterianos (CEUAX N 4516111214), entre Janeiro e Dezembro de 2016 (CARDOSO, 2017). Os 51 peixes restantes foram avaliados entre os anos de 2018 (n=11) e 2019 (n=40). Todos os isolamentos bacterianos foram realizados no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Resistência a Antimicrobianos, coordenado pela professora doutora Andrea Micke Moreno.

Os animais avaliados apresentaram septicemia, lesão de pele e/ou lesão ocular. As amostras das quais foram isoladas as estirpes eram compostas pelo órgão afetado acondicionado em bolsa plástica estéril ou por suabes coletados de forma asséptica diretamente no local da lesão, sendo acondicionados em meio de cultura de Amies (ABSORVE™). As amostras foram mantidas sob refrigeração (4°C) até a chegada ao laboratório para o processamento (até 72 horas).

4.2 Bacteriológico

Para o isolamento bacteriano, os fragmentos de órgãos ou suabes foram semeados em ágar MacConkey e ágar dextrina-ampicilina (Difco-BBL, Detroit, MI /USA). As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas em aerobiose. As colônias bacterianas isoladas foram semeadas em 3 mL de caldo BHI (*Brain Heart*

Infusion) (Difco) e a partir deste cultivo foi separada uma alíquota para estoque a -86°C.

Para realização do presente projeto foram descongeladas alíquotas das estirpes previamente isoladas (descritas acima). Para verificação de pureza e avaliação de atividade hemolítica, as estirpes foram re-isoladas em ágar MacConkey e ágar Sangue (5% de sangue de carneiro) (Difco-BBL). As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas em aerobiose. As colônias bacterianas isoladas foram semeadas em 2 mL de caldo BHI (Difco-BBL) e submetidas às diferentes técnicas fenotípicas e genotípicas propostas.

4.3 Identificação das estirpes por espectrometria de massa MALDI-TOF

Uma alíquota de 1 mL do cultivo bacteriano foi utilizada para extração de proteínas para a realização da espectrometria de massa MALDI-TOF. Para tanto, utilizou-se o protocolo descrito por Hijazin et al. (2012). Os extratos proteicos obtidos foram armazenados a -20°C.

A leitura pelo MALDI-TOF MS foi realizada no espectrofotômetro de massa Microflex™ (Bruker Daltonik) da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, com o auxílio técnico da doutora Maria Inês Zanoli Sato e sua equipe. Para leitura, 1 uL de suspensão proteica foi transferido para a placa de aço inox e adicionado 1 uL da matrix (ácido α -ciano-4-hidróxido-cinamico). Cada estirpe foi distribuída em triplicata e para cada placa foram realizadas duas leituras. Para captura dos espectros proteicos foi utilizado o programa FlexControl™ (Bruker Daltonik) pelo método MTB_autoX. O espectrofotômetro foi externamente calibrado

através da utilização de proteínas ribossômicas de *Escherichia coli* (BTS - Bruker Daltonik).

Para a identificação bacteriana pelo espectro proteico foi utilizado o programa BioTyper™ (MALDI Biotyper CA Systems) 3.0 (Bruker Daltonik). Os critérios para interpretação da fabricante Bruker Daltonik foram utilizados neste estudo como segue: escores ≥ 2.0 foram aceitos para atribuição de espécie, e escores ≥ 1.7 e < 2.0 foram utilizados para identificação de gênero.

4.4 Caracterização genotípica

4.4.1 Extração do DNA

Uma alíquota de 1 mL do cultivo bacteriano foi utilizada para extração do DNA de acordo com o protocolo descrito por Boom et al. (1990). As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até o processamento.

4.4.2 Identificação genotípica das espécies

A identificação genotípica das estirpes foi realizada pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR). Para tanto, foram pesquisados os genes *gyrB*, *rpoB* e *ahal* (Quadro 1), sendo este último codificador de uma adesina especificamente relacionada à espécie *A. hydrophila*. Para a identificação das espécies *A. hydrophila* (AHA) e *A. caviae* (ACA) foi padronizada uma reação de PCR multiplex, enquanto para a identificação de *A. veronii* (AVE) foi padronizada uma reação de PCR simples.

As reações foram realizadas utilizando-se 5 μl do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl_2 , 10 pmoles de cada iniciador (Quadro 1), 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 1 X

tampão de PCR, 200mM de cada dNTP e água até o volume final de 50 µl. Foi utilizado o termociclador (Bio-Rad Laboratories) programado da seguinte forma:

- Multiplex de detecção de *A. hydrophila* (AHA) e *A. caviae* (ACA): um ciclo a 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 45 segundos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos;
- PCR simples para identificação de *A. veronii* (AVE): um ciclo a 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de 94°C por 40 segundos, 65°C por 50 segundos, 72°C por 40 segundos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando-se tampão TBE 0,5 X (Tris-base 45 mM, ácido bórico 45 mM e EDTA 1 mM, pH 8) e voltagem de 110V durante 1 hora. Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação *Gel Doc XR* (Bio Rad), sendo os fragmentos corados com *BlueGreen*TM (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA *Ladder*TM (New EnglandBioLabs Inc).

Quadro 1: Iniciadores e respectivos tamanhos dos produtos de amplificação para a identificação das espécies e genes de virulência de *Aeromonas*.

| Espécie | Gene | Sequência de oligonucleotídeo | Tamanho (pb) | Referência |
|----------------------|-------------|---|--------------|-----------------------|
| <i>A. caviae</i> | <i>gyrB</i> | TGCTGCTGACCATCCGC GGTGCCTGCGGCTCG | 70 | Persson et al. (2015) |
| <i>A. hydrophila</i> | <i>ahal</i> | GAGAAGGTGACCACCAAGAACA GAGATGTCAGCCTTGTAGAGCT | 200 | Sebastião (2015) |
| <i>A. veronii</i> | <i>rpoB</i> | CGTGCCGGCTTTGAAGTC GATCACGTACTIONGCCTTCTTCAATA | 224 | Persson et al. (2015) |

4.4.3 Pesquisa de genes de virulência de *Aeromonas*

As estirpes de *Aeromonas* spp. foram submetidas à pesquisa dos genes de virulência relacionados a infecção. O Quadro 2 apresenta os iniciadores utilizados na PCR para amplificar fragmentos de diferentes genes codificadores dos fatores de virulência: enterotoxina citotônica termolábil (*alt*), aerolisina (*aer*), enterotoxina citotóxica (*act*), enterotoxina citotônica termoestável (*ast*), flagelina (*fla*) e hemolisina (*hlyA*).

Para a detecção dos genes de virulência, as reações de PCR foram realizadas utilizando-se 5 µl do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada iniciador (Quadro 2), 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão de PCR, 200mM de cada dNTP e água até o volume final de 50 µl. Os parâmetros de tempo e temperatura dos programas das respectivas reações foram ajustados segundo o descrito por Khor et al. (2015). Foi utilizado o termociclador (Bio-Rad Laboratories) programado da seguinte forma:

- PCR para detecção dos genes *alt* e *ast*: um ciclo a 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 45 segundos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.
- PCR para detecção do gene *aer*: um ciclo a 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 59°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.
- PCR para detecção do gene *act*: um ciclo a 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 57°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.
- PCR para detecção do gene *fla*: um ciclo a 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto, 72°C por 45 segundos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.
- PCR para detecção do gene *hlyA*: um ciclo a 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e um ciclo final de 72°C por 10 minutos.

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando-se tampão TBE 0,5 X (Tris-base 45 mM, ácido bórico 45 mM e EDTA 1 mM, pH 8) e voltagem de 110 V durante 1 hora. Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação *Gel Doc XR* (Bio Rad), sendo os fragmentos corados com

BlueGreen[™] (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA *Ladder*[™] (New EnglandBioLabs Inc).

Quadro 2: Iniciadores utilizados para detecção de diferentes genes codificadores de fatores de virulência de *Aeromonas*.

| Gene | Alvo | Sequência do oligonucleotídeo | Tamanho (pb) | Referência |
|-------------|--------------------------------------|---|--------------|--------------------------------|
| <i>act</i> | Enterotoxina citotóxica | AGAAGGTGACCACCAAGAACA AACTGACATCGGCCTTGAAGTC | 232 | Kingombe et al. (1999) |
| <i>aer</i> | Aerolisina | CCTATGGCCTGAGCGAGAAG CCAGTTCCAGTCCCACCACT | 431 | Nawaz et al. (2010) |
| <i>alt</i> | Enterotoxina citotônica termolábil | AAAGCGTCTGACAGCGAAGT AGCGCATAGGCGTTCTCTT | 320 | Aguilera-Arreola et al. (2005) |
| <i>ast</i> | Enterotoxina citotônica termoestável | ATCGTCAGCGACAGCTTCTT CTCATCCCTTGGCTTGTTGT | 504 | Aguilera-Arreola et al. (2005) |
| <i>fla</i> | Flagelina | TCCAACCGTYTGACCTC GMYTGGTTGCGRATGGT | 608 | Nawaz et al. (2010) |
| <i>hlyA</i> | Hemolisina | ATGAGTTTTGCCGATAGTTTATTTTTCTGA TTACGATTCTGAGCGGGCTTGTCGGCCGGCGTG | 1320 | Ravi et al. (2019) |

4.4.4 Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (SE-AFLP)

A tipificação genotípica, por meio da técnica de polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), foi realizada para cada espécie identificada nas amostras estudadas. Para SE-AFLP, foi utilizado o protocolo de McLauchlin et al. (2000) com restrição única pela enzima *Hind*III (New England Biolabs). Os fragmentos de DNA foram detectados através de eletroforese a 90 V por 4 horas em gel de agarose (2%) corado com *BlueGreen*[™] (LGC Biotecnologia). As imagens foram capturadas sob iluminação UV pelo sistema Gel Doc XR (Bio-Rad

Laboratories). Os fragmentos amplificados foram identificados com base no marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

4.5 Perfil de resistência aos antimicrobianos

A caracterização do perfil de resistência aos antimicrobianos foi realizada pela técnica de disco-difusão, conforme os padrões definidos no documento VET01-S2 (CLSI, 2020).

Para a preparação do inóculo, as estirpes foram cultivadas em caldo BHI (Difco) e incubadas a 37°C por 24 horas. A turbidez do cultivo foi ajustada com solução salina estéril (0,9%) de modo a obter uma turbidez óptica compa equivalente a 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 1×10^8 UFC/mL). Uma vez ajustada, a suspensão bacteriana foi distribuída, com o auxílio de um suabe estéril, em placa com meio de cultura ágar Mueller Hinton (Difco) de maneira a obter uma cobertura homogênea da placa. Posteriormente, foram aplicados de forma asséptica os discos contendo antibióticos e as placas foram incubadas em estufa a 35°C por 16 a 18 horas conforme descrito no documento M45 (CLSI, 2020). Os antimicrobianos avaliados e os respectivos pontos de corte são apresentados no Quadro 3. Para enrofloxacin, florfenicol e gentamicina os resultados também foram avaliados utilizando os pontos de corte epidemiológicos (ECOFF) de acordo com o documento VET04 (CLSI, 2020) (Quadro 4).

Quadro 3: Antimicrobianos avaliados e respectivas concentrações e pontos de corte utilizados.

| Antimicrobiano | Concentração (µg/mL) | Pontos de corte para classificação | | |
|-----------------------------|----------------------|------------------------------------|---------------|------------|
| | | Sensível | Intermediário | Resistente |
| Cefepima | 30 | ≥25 | 19-24 | ≤18 |
| Cefoxitina | 30 | ≥18 | 15-17 | ≤14 |
| Ceftazidima | 30 | ≥21 | 18-20 | ≤17 |
| Ceftriaxona | 30 | ≥23 | 20-22 | ≤19 |
| Imipenem | 10 | ≥23 | 20-22 | ≤19 |
| Piperacilina-tazobactam | 110 | ≥21 | 18-20 | ≤17 |
| Tetraciclina | 30 | ≥15 | 12-14 | ≤11 |
| Enrofloxacina* | 5 | ≥23 | 17-22 | ≤16 |
| Ciprofloxacina | 5 | ≥21 | 16-20 | ≤15 |
| Amicacina | 30 | ≥17 | 15-16 | ≤14 |
| Gentamicina* | 10 | ≥16 | 13-15 | ≤12 |
| Eritromicina | 15 | ≥23 | 14-22 | ≤13 |
| Clorafenicol | 30 | ≥18 | 13-17 | ≤12 |
| Florfenicol* | 30 | ≥22 | 19-21 | ≤18 |
| Sulfonamida | 300 | ≥17 | 13-16 | ≤12 |
| Sulfametoxazol-tripmetropim | 25 | ≥16 | 11-15 | ≤10 |

Ativos marcados com * tem ponto de corte proveniente do documento CLSI VET 01S – 5th ed., outros antimicrobianos seguem com ponto de corte do documento CLSI suplemento M100 – 32nd. ed.

Quadro 4: Antimicrobianos avaliados considerando ECOFF.

| Antimicrobiano | Concentração (µg/mL) | Pontos de corte para classificação | |
|----------------|----------------------|------------------------------------|-----|
| | | WT* | NWT |
| Enrofloxacina | 5 | ≥32 | ≤31 |
| Florfenicol | 30 | ≥25 | ≤24 |
| Gentamicina | 10 | ≥19 | ≤18 |

*WT - estirpes selvagens, NWT - estirpes não selvagens, interpretação proveniente do documento CLSI - VET04, 3rd ed.

4.6 Análise dos resultados

A distribuição das frequências das estirpes segundo espécie e origem foi realizada com o programa SPSS 16.0 (SPSS Inc). Para a avaliação da concordância entre as técnicas MALDI-TOF MS e PCR para a identificação das espécies de *Aeromonas*, utilizou-se o coeficiente de *Kappa* (k) e o teste de simetria e homogeneidade, realizado com o programa Stata 12.0 (StataCorp, 2011). As espécies identificadas e o fenótipo de hemólise foram trabalhados como variáveis categóricas e as diferenças analisadas pelo teste de Fisher-Freeman-Halton com a probabilidade bilateral estimada pelo método de Monte Carlo. Para as análises realizadas foi considerado nível de significância de 5 %.

Para a análise de agrupamento dos perfis da SE-AFLP, foi construído um dendrograma, para cada espécie, utilizando o coeficiente de Dice e o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Para a distinção dos genótipos foi utilizado o ponto de corte de 90% de similaridade genética (VAN BELKUN et al., 2007).

O perfil de resistência das espécies isoladas foi determinado com base nos pontos de corte disponíveis nos documentos M100, VET01S e VET04 do CLSI (2020, 2021, 2022). A classificação de multirresistência foi determinada conforme descrito por Schwarz et al. (2010), considerando resistência a 3 ou mais classes de antimicrobianos.

Para a análise de agrupamento dos perfis de virulência também foi utilizado o programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths), sendo necessária a transformação dos perfis para dados binários. Um dendrograma foi construído para cada espécie bacteriana utilizando o coeficiente de “*different values*” e o método de Ward.

5. RESULTADOS

Das 300 estirpes estudadas, 235 (78,0%) foram isoladas no ano de 2016, 13 (4,3%) foram isoladas em 2018, e as 52 estirpes restantes (17,0%) foram obtidas no ano de 2019. Foi selecionada uma média de 2,5 estirpes por animal avaliado, considerando a possibilidade de variação de sítio de isolamento e espécies de *Aeromonas*.

A partir da identificação pela espectrometria de massa MALDI-TOF, foram detectadas 158 (52,67%) estirpes de *A. veronii*, 125 (41,67%) de *A. hydrophila*, e apenas 17 (5,67%) de *A. caviae* (Tabela 1). Este resultado corresponde a primeira de duas opções “*match*” de identificação geradas pelo programa BioTyper™ com escore > 2.0.

A identificação das espécies de *Aeromonas* foi confirmada pela identificação genotípica. A partir da padronização das PCRs, foi possível observar os seguintes resultados: 53,0% (159/300) das estirpes foram identificadas como *A. veronii*, 41,3% (124/300) como *A. hydrophila*, e 5,7% (17/300) restante como *A. caviae* (Tabela 1).

Pode-se observar que apesar das discrepâncias pontuais entre as técnicas de identificação dessas três espécies de *Aeromonas*, não foi detectada diferença significativa entre elas. Também apresentaram boa concordância pelo coeficiente de *Kappa* (Tabela 1).

Tabela 1: Identificação das espécies de *Aeromonas* pelas técnicas MALDI-TOF MS e PCR – N (%).

| ID PCR | ID MALDI-TOF MS | | | Total |
|----------------------|-------------------|----------------------|------------------|------------|
| | <i>A. veronii</i> | <i>A. hydrophila</i> | <i>A. caviae</i> | |
| <i>A. veronii</i> | 141 (89,2) | 18 (14,4) | 0 | 159 (53,0) |
| <i>A. hydrophila</i> | 16 (10,2) | 103 (82,4) | 5 (29,4) | 124 (41,3) |
| <i>A. caviae</i> | 1 (0,6) | 4 (3,2) | 12 (70,6) | 17 (5,7) |
| Total | 158 (100) | 125 (100) | 17 (100) | 300 (100) |

a. $p = 0,7461$ (Probabilidade do Teste de Simetria assintótica)

b. $Kappa = 0,731$; $p < 0,001$

No entanto, destaca-se que em mais de 90% das estirpes foi observado que a espectrometria de massa MALDI-TOF resultou em dois melhores “*matches*” de identificação para duas espécies diferentes de *Aeromonas*, dentre as três detectadas, com escores ≥ 2.0 . Portanto, apesar de apresentar boa concordância com a identificação genotípica, o resultado da espectrometria de massa também suscita dúvida para adequada atribuição de espécie dentro do gênero *Aeromonas*. Dessa forma, para a continuidade das análises deste projeto optou-se pela utilização dos resultados gerados pela identificação genotípica das estirpes.

Considerando os perfis de isolamento ou infecção pelo agente, foi observado que 67,5% (83/123) dos peixes apresentaram infecção por uma única espécie de *Aeromonas*, enquanto 30,9% (38/123) foram infectados simultaneamente por duas espécies, e em apenas dois animais (1,6%) foram detectadas as três espécies concomitantemente (Tabela 2). A partir desses resultados, foram propostos perfis de infecção dos animais considerando as três espécies identificadas do gênero *Aeromonas*.

Dessa forma, foram identificados sete perfis de infecção (P1 a P7) considerando a combinação das espécies *A. veronii*, *A. hydrophila* e *A. caviae* (Tabela 2). Destacam-se os perfis P1, P2 e P4 que apresentaram as maiores frequências e correspondem, respectivamente, às espécies *A. veronii* e *A. hydrophila* detectadas isoladas e concomitantemente.

Tabela 2: Distribuição dos perfis de infecção das espécies de *Aeromonas* de acordo com os animais estudados.

| Perfil de infecção | Espécie(s) | N | % |
|---------------------------|--------------------|----------|----------|
| P1 | AVE | 43 | 35,0 |
| P2 | AHY | 37 | 30,1 |
| P3 | ACA | 3 | 2,4 |
| P4 | AVE/AHY | 29 | 23,6 |
| P5 | AVE/ACA | 6 | 4,9 |
| P6 | AHY/ACA | 3 | 2,4 |
| P7 | AVE/AHY/ACA | 2 | 1,6 |

AVE - *A. veronii*; AHY - *A. hydrophila*; ACA - *A. caviae*.

A partir da identificação das estirpes de *Aeromonas* estudadas, também foi avaliada a sua distribuição em relação à origem, considerando as espécies de peixes acometidas (Tabela 3), os quadros clínicos observados (Tabela 4) e os seus respectivos sítios de isolamento (Tabela 5).

Tabela 3: Distribuição de frequência das espécies de *Aeromonas* identificadas segundo as espécies de peixes estudadas – N (%).

| Espécie de peixe | ID PCR | | | Total |
|---------------------------------------|-------------------|----------------------|------------------|----------|
| | <i>A. veronii</i> | <i>A. hydrophila</i> | <i>A. caviae</i> | |
| <i>Carassius auratus</i> | 41 (52,6) | 35 (44,9) | 2 (2,5) | 78 (100) |
| <i>Cyprinus carpio</i> | 38 (53,5) | 33 (46,5) | 0 | 71 (100) |
| <i>Trichogaster trichopterus</i> | 18 (64,3) | 9 (32,1) | 1 (3,6) | 28 (100) |
| <i>Trichogaster lalius</i> | 1 (6,25) | 14 (87,5) | 1 (6,25) | 16 (100) |
| <i>Mikrogeophagus altispinosus</i> | 5 (33,3) | 10 (66,7) | 0 | 15 (100) |
| <i>Danio rerio</i> | 6 (66,7) | 1 (11,1) | 2 (22,2) | 9 (100) |
| <i>Symphysodon discus</i> | 6 (66,7) | 2 (22,2) | 1 (11,1) | 9 (100) |
| <i>Cichlasoma salvini</i> | 6 (75,0) | 0 | 2 (25,0) | 8 (100) |
| <i>Barbodes semifasciolatus</i> | 4 (66,7) | 2 (33,3) | 0 | 6 (100) |
| <i>Cichlasoma meeki</i> | 1 (16,7) | 2 (33,3) | 3 (50,0) | 6 (100) |
| <i>Pterophyllum scalare</i> | 4 (66,6) | 1 (16,7) | 1 (16,7) | 6 (100) |
| <i>Poecilia reticulata</i> | 2 (40,0) | 3 (60,0) | 0 | 5 (100) |
| <i>Trichopodus leerii</i> | 2 (40,0) | 2 (40,0) | 1 (20,0) | 5 (100) |
| <i>Polypterus senegalus</i> | 4 (100) | 0 | 0 | 4 (100) |
| <i>Puntigrus tetrazona</i> | 4 (100) | 0 | 0 | 4 (100) |
| <i>Puntius conchonius</i> | 4 (100) | 0 | 0 | 4 (100) |
| <i>Betta splendens</i> | 2 (66,7) | 1 (33,3) | 0 | 3 (100) |
| <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> | 2 (66,7) | 0 | 1 (33,3) | 3 (100) |
| <i>Pangasius hypophthalmus</i> | 2 (66,7) | 1 (33,3) | 0 | 3 (100) |
| <i>Trichopodus trichopterus</i> | 2 (66,7) | 1 (33,3) | 0 | 3 (100) |
| <i>Throrichthys meeki</i> | 0 | 2 (100) | 0 | 2 (100) |
| <i>Tropheus moorii</i> | 0 | 1 (50,0) | 1 (50,0) | 2 (100) |
| <i>Cyphotilapia frontosa</i> | 1 (100) | 0 | 0 | 1 (100) |
| <i>Demasoni pombo</i> | 1 (100) | 0 | 0 | 1 (100) |
| <i>Epalzeorhynchus bicolor</i> | 0 | 0 | 1 (100) | 1 (100) |
| <i>Hemiodus gracilis</i> | 0 | 1 (100) | 0 | 1 (100) |
| <i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i> | 1 (100) | 0 | 0 | 1 (100) |
| <i>Maylandia zebra</i> | 1 (100) | 0 | 0 | 1 (100) |
| <i>Mealanotaenia trifasciata</i> | 0 | 1 (100) | 0 | 1 (100) |
| <i>Moenkhausia costae</i> | 1 (100) | 0 | 0 | 1 (100) |
| <i>Parambassis ranga</i> | 0 | 1 (100) | 0 | 1 (100) |
| <i>Puntius tetrazona</i> | 0 | 1 (100) | 0 | 1 (100) |

Tabela 4: Distribuição de frequência das espécies de *Aeromonas* identificadas segundo as afecções observadas – N (%).

| Quadro Clínico | <i>A. veronii</i> | <i>A. hydrophila</i> | <i>A. caviae</i> | Total |
|----------------------------|-------------------|----------------------|------------------|------------------|
| Septicemia | 55 (34,6) | 31 (25,0) | 5 (29,4) | 91 (30,3) |
| Lesão ocular e septicemia | 48 (30,2) | 35 (28,2) | 7 (41,2) | 90 (30,0) |
| Lesão ocular | 15 (9,4) | 30 (24,2) | 3 (17,6) | 48 (16,0) |
| Lesão de pele | 22 (13,8) | 17 (13,7) | 1 (5,9) | 40 (13,3) |
| Lesão de pele e septicemia | 19 (11,9) | 11 (8,9) | 1 (5,9) | 31 (10,3) |
| Total | 159 (100) | 124 (100) | 17 (100) | 300 (100) |

Tabela 5: Distribuição de frequência das espécies de *Aeromonas* identificadas segundo o sítio de isolamento.

| Sítio de isolamento | <i>A. veronii</i> | <i>A. hydrophila</i> | <i>A. caviae</i> | Total |
|------------------------------|-------------------|----------------------|------------------|------------------|
| Olhos | 21 (13,2) | 37 (29,8) | 6 (35,3) | 64 (21,3) |
| Órgãos internos ¹ | 24 (15,1) | 13 (10,5) | 5 (29,4) | 42 (14,0) |
| Fígado | 23 (14,5) | 13 (10,5) | 1 (5,9) | 37 (12,3) |
| Brânquias | 17 (10,7) | 15 (12,1) | 3 (17,6) | 35 (11,7) |
| Pele | 18 (11,3) | 14 (11,3) | 0 | 32 (10,7) |
| Cérebro | 12 (7,5) | 10 (8,1) | 0 | 22 (7,3) |
| Cavidade celomática | 13 (8,2) | 2 (1,6) | 0 | 15 (5,0) |
| Rim | 7 (4,4) | 6 (4,8) | 0 | 13 (4,3) |
| Intestino | 8 (5,0) | 4 (3,2) | 0 | 12 (4,0) |
| Baço | 5 (3,1) | 5 (4,0) | 1 (5,9) | 11 (3,7) |
| Coração | 2 (1,3) | 2 (1,6) | 0 | 4 (1,3) |
| Nadadeira | 4 (2,5) | 0 | 0 | 4 (1,3) |
| Aparelho reprodutor | 1 (0,6) | 0 | 1 (5,9) | 2 (0,7) |
| Fígado e Brânquias | 0 | 2 (1,6) | 0 | 2 (0,7) |
| Opérculo | 1 (0,6) | 1 (0,8) | 0 | 2 (0,7) |
| Baço e brânquias | 1 (0,6) | 0 | 0 | 1 (0,3) |
| Ovos retidos | 1 (0,6) | 0 | 0 | 1 (0,3) |
| Peixe inteiro ² | 1 (0,6) | 0 | 0 | 1 (0,3) |
| Total | 159 (100) | 124 (100) | 17 (100) | 300 (100) |

¹ Pool de órgãos. ² Animal apresentando erosão na região dorsal.

Dentre esses resultados, destaca-se que 70,6% das estirpes de *A. caviae* foram detectadas em animais apresentando septicemia com ou sem lesão ocular associada. De forma semelhante, 64,7% das estirpes de *A. caviae* foram isoladas de amostras de *pool* de órgãos e de olhos.

Em relação à avaliação de atividade hemolítica, foi observado que 86,0% das estirpes estudadas apresentaram beta-hemólise (hemólise completa), enquanto 14,0% apresentaram alfa-hemólise (hemólise parcial) (Tabela 6). A avaliação da distribuição das espécies de *Aeromonas* identificadas em relação à atividade hemolítica (Tabela 6) resultou em diferença estatística significativa. Esta diferença está relacionada ao predomínio de estirpes de *A. veronii* e *A. hydrophila* que apresentaram fenótipo de beta-hemólise.

Tabela 6: Distribuição de frequência das espécies de *Aeromonas* identificadas segundo o fenótipo de hemólise.

| ID PCR | Hemólise | | Total |
|----------------------|-----------|------------|-----------|
| | Alfa | Beta | |
| <i>A. veronii</i> | 26 (16,4) | 133 (83,6) | 159 (100) |
| <i>A. hydrophila</i> | 7 (5,6) | 117 (94,4) | 124 (100) |
| <i>A. caviae</i> | 9 (52,9) | 8 (47,1) | 17 (100) |
| Total | 42 (14,0) | 258 (86,0) | 300 (100) |

Probabilidade estimada pelo teste de Fisher-Freeman-Halton $p < 0,001$.

Em relação aos seis genes de virulência pesquisados nas 300 estirpes de *Aeromonas*, foram observados os seguintes resultados: o gene *act* foi detectado em 271 (90,3%) estirpes, *aer* em 238 (79,3%), *fla* em 175 (58,3%), *hlyA* em 131 (43,7%), *alt* em 130 (43,3%), e o gene *ast* em 106 (35,3%). A espécie *A. hydrophila*

apresentou mais de 50% de suas estirpes positivas para os genes estudados, enquanto as estirpes de *A. veronii* apresentaram maior proporção de *aer*, *act* e *fla*; já dentre as 17 estirpes de *A. caviae* houve predomínio dos genes *hlyA* e *fla* (Figura 1).

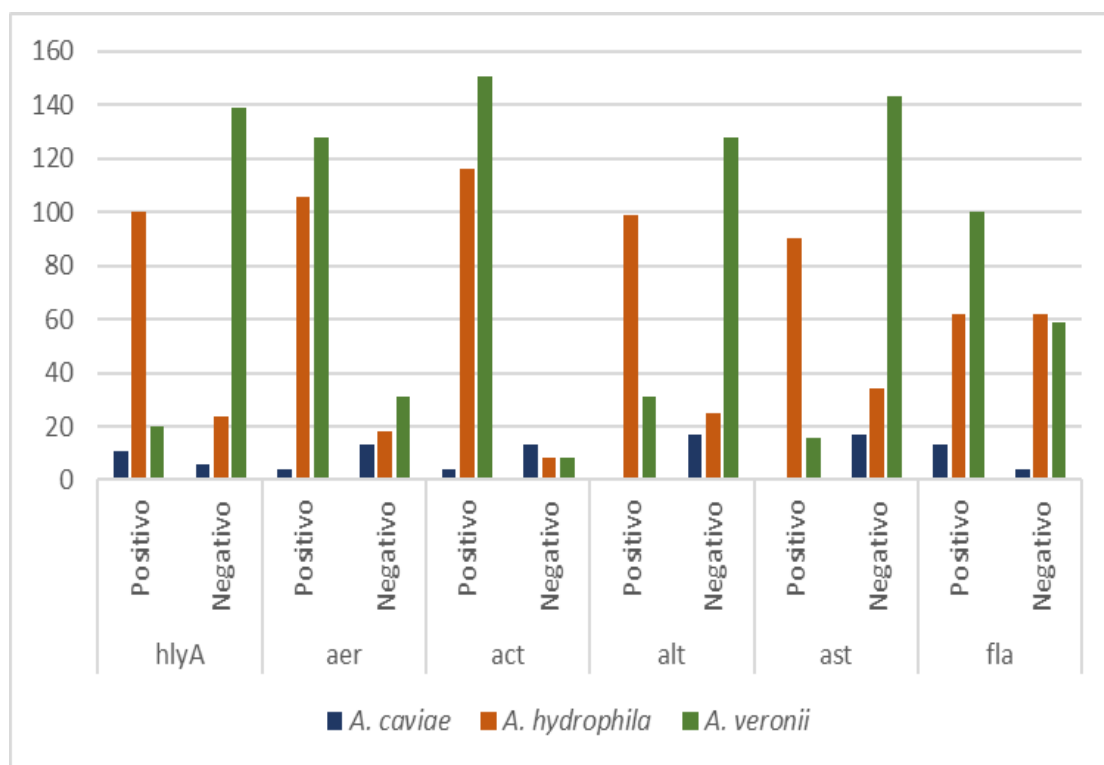


Figura 1: Gráfico representativo da distribuição dos genes de virulência detectados segundo as espécies de *Aeromonas*

Foi detectada diferença estatística significativa para os genes *hlyA* ($p < 0,001$), *act* ($p < 0,001$), *alt* ($p < 0,001$), *ast* ($p < 0,001$), e *fla* ($p = 0,029$) e o fenótipo de alfa- e beta-hemólise (Figura 2). Apesar de ser observada uma tendência de predomínio dos genes *aer*, *act* e *fla* em relação aos quadros clínicos originários (Figura 3), apenas foi detectada diferença estatística significativa para o gene *fla* ($p = 0,08$).

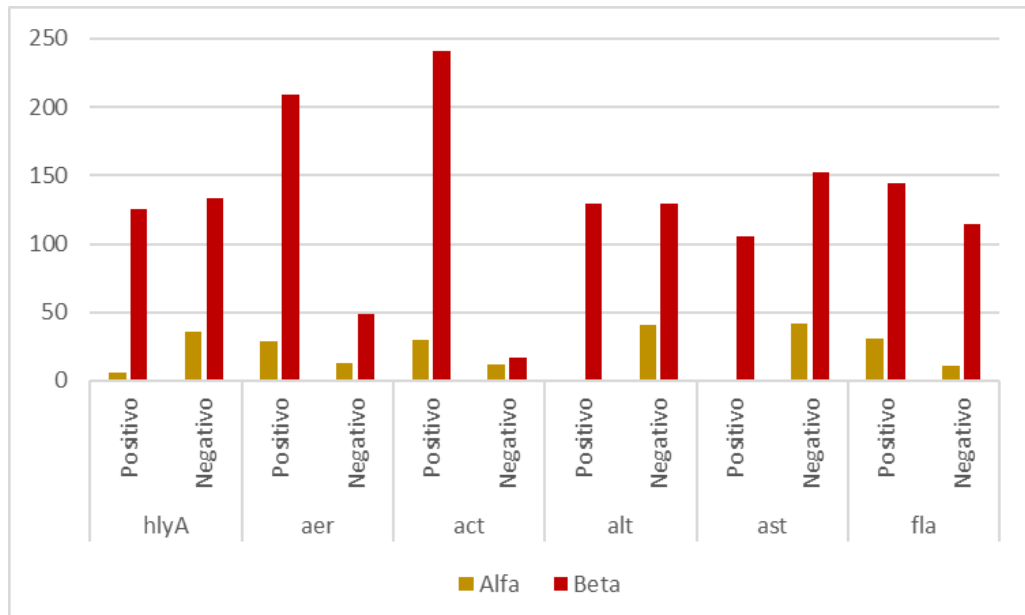


Figura 2: Gráfico representativo da distribuição dos genes de virulência detectados segundo o fenótipo de alfa- e beta-hemólise.

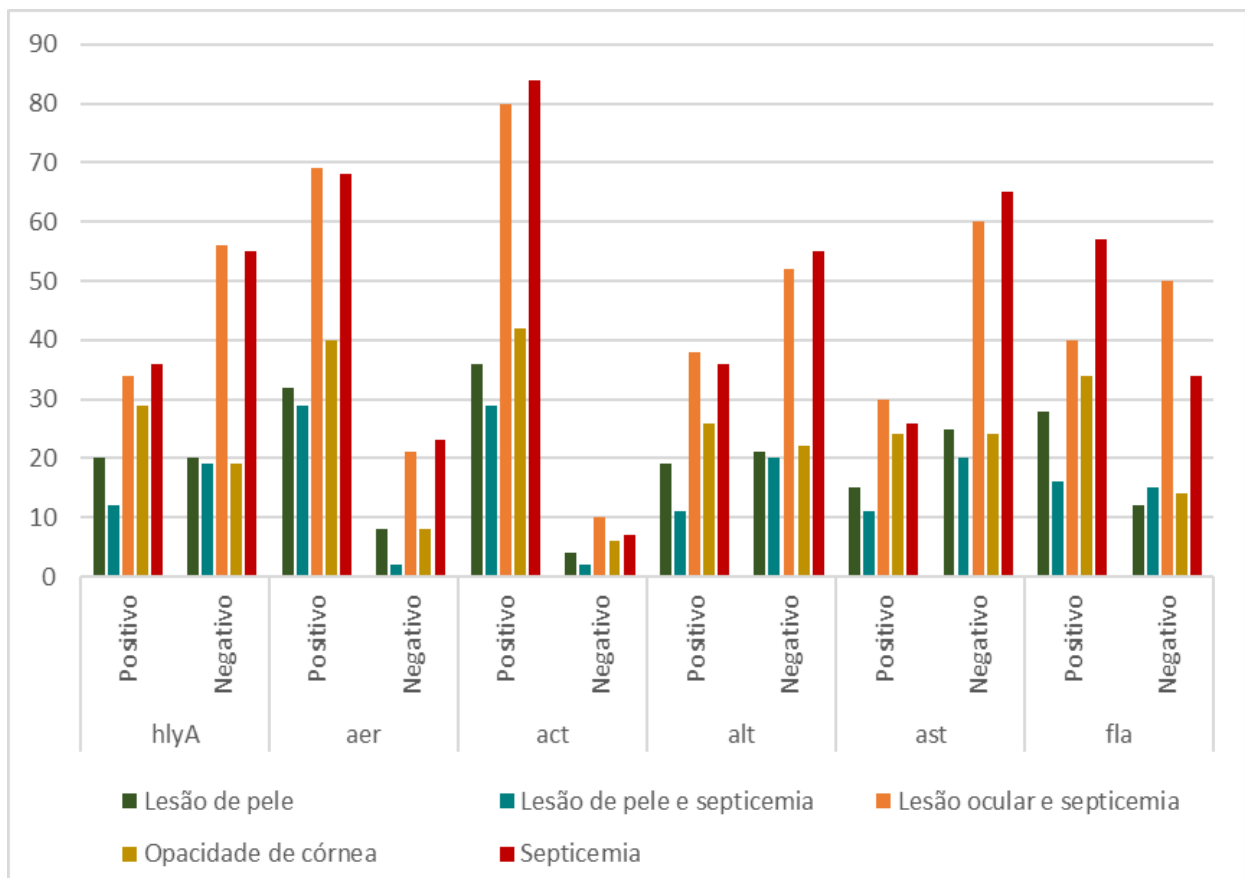


Figura 3: Gráfico representativo da distribuição dos genes de virulência detectados segundo os quadros clínicos observados.

Foram identificados 30 perfis de virulência considerando a combinação dos resultados das PCRs (Figura 4 e Tabela 7). Destaca-se que os cinco principais perfis contêm 227 estirpes (75,7%) (perfis V1 a V5). Apenas cinco (1,7%) estirpes foram negativas para todos os genes (perfil V10), sendo estas identificadas como *A. caviae* e *A. veronii*; enquanto 31 estirpes (10,3%) foram positivas para todos os genes (perfil V4) das quais 30 são *A. hydrophila*, correspondendo a 24,2% destas. Não foi observada relação entre os perfis de virulência e os quadros clínicos de origem (Figura 5 e 6).

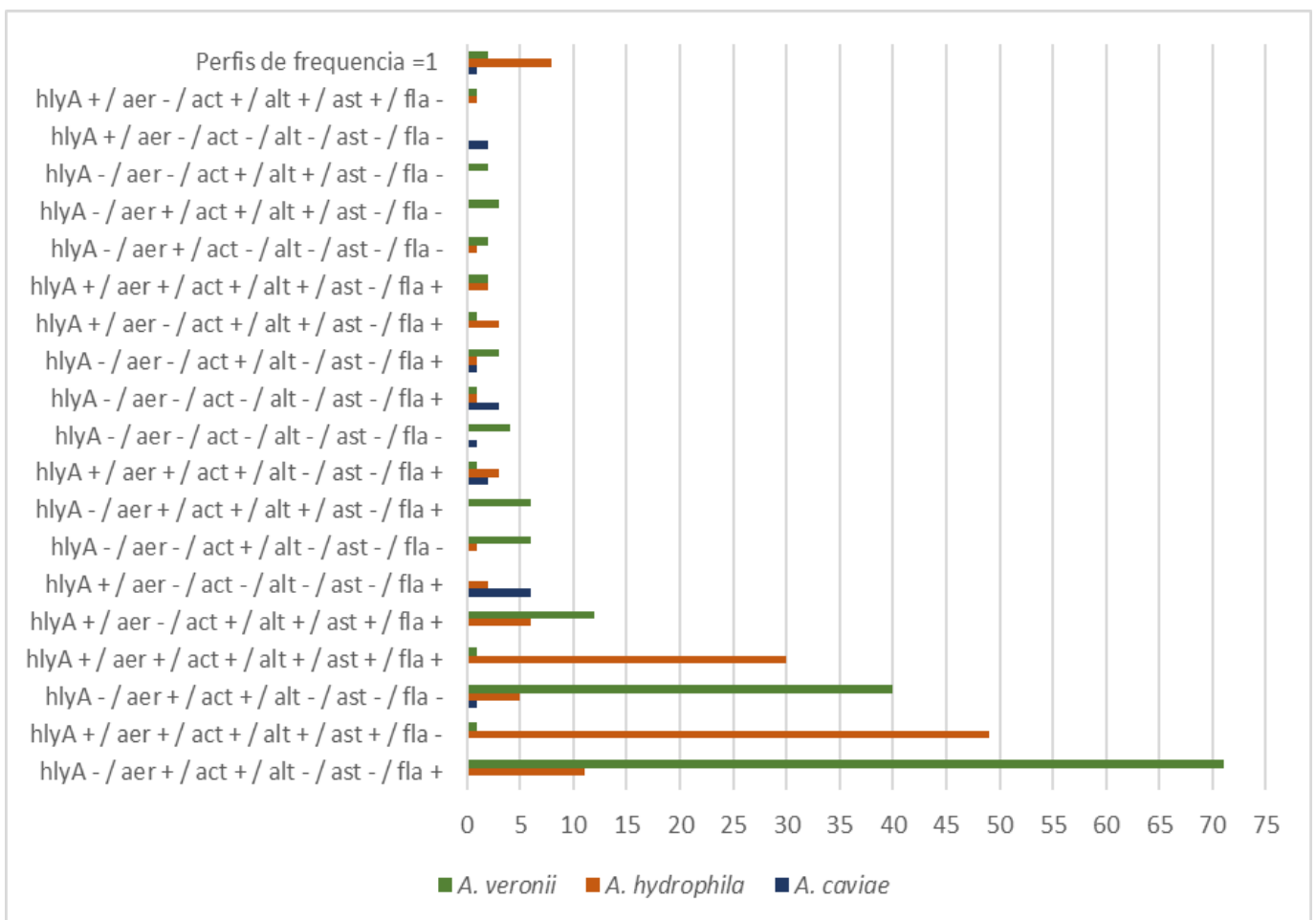


Figura 4: Gráfico representativo da distribuição dos principais perfis de virulência identificados segundo as espécies de *Aeromonas*.

Tabela 7: Distribuição de frequência dos perfis de virulência identificados segundo a espécie de *Aeromonas*.

| Perfil | Perfil de Virulência | <i>A. caviae</i> | <i>A. hydrophila</i> | <i>A. veronii</i> | Total |
|--------------|--|------------------|----------------------|-------------------|-----------|
| V1 | <i>hlyA</i> - / <i>aer</i> + / <i>act</i> + / <i>alt</i> - / <i>ast</i> - / <i>fla</i> + | 0 | 11 (8,9) | 71 (44,7) | 82 (27,3) |
| V2 | <i>hlyA</i> + / <i>aer</i> + / <i>act</i> + / <i>alt</i> + / <i>ast</i> + / <i>fla</i> - | 0 | 49 (39,5) | 1 (0,6) | 50 (16,7) |
| V3 | <i>hlyA</i> - / <i>aer</i> + / <i>act</i> + / <i>alt</i> - / <i>ast</i> - / <i>fla</i> - | 1 (5,9) | 5 (4,0) | 40 (25,2) | 46 (15,3) |
| V4 | <i>hlyA</i> + / <i>aer</i> + / <i>act</i> + / <i>alt</i> + / <i>ast</i> + / <i>fla</i> + | 0 | 30 (24,2) | 1 (0,6) | 31 (10,3) |
| V5 | <i>hlyA</i> + / <i>aer</i> - / <i>act</i> + / <i>alt</i> + / <i>ast</i> + / <i>fla</i> + | 0 | 6 (4,8) | 12 (7,5) | 18 (6,0) |
| V6 | <i>hlyA</i> + / <i>aer</i> - / <i>act</i> - / <i>alt</i> - / <i>ast</i> - / <i>fla</i> + | 6 (35,3) | 2 (1,6) | 0 | 8 (2,7) |
| V7 | <i>hlyA</i> - / <i>aer</i> - / <i>act</i> + / <i>alt</i> - / <i>ast</i> - / <i>fla</i> - | 0 | 1 (0,8) | 6 (3,8) | 7 (2,3) |
| V8 | <i>hlyA</i> - / <i>aer</i> + / <i>act</i> + / <i>alt</i> + / <i>ast</i> - / <i>fla</i> + | 0 | 0 | 6 (3,8) | 6 (2,0) |
| V9 | <i>hlyA</i> + / <i>aer</i> + / <i>act</i> + / <i>alt</i> - / <i>ast</i> - / <i>fla</i> + | 2 (11,8) | 3 (2,4) | 1 (0,6) | 6 (2,0) |
| V10 | <i>hlyA</i> - / <i>aer</i> - / <i>act</i> - / <i>alt</i> - / <i>ast</i> - / <i>fla</i> - | 1 (5,9) | 0 | 4 (2,5) | 5 (1,7) |
| V11 | <i>hlyA</i> - / <i>aer</i> - / <i>act</i> - / <i>alt</i> - / <i>ast</i> - / <i>fla</i> + | 3 (17,6) | 1 (0,8) | 1 (0,6) | 5 (1,7) |
| V12 | <i>hlyA</i> - / <i>aer</i> - / <i>act</i> + / <i>alt</i> - / <i>ast</i> - / <i>fla</i> + | 1 (5,9) | 1 (0,8) | 3 (1,9) | 5 (1,7) |
| V13 | <i>hlyA</i> + / <i>aer</i> - / <i>act</i> + / <i>alt</i> + / <i>ast</i> - / <i>fla</i> + | 0 | 3 (2,4) | 1 (0,6) | 4 (1,3) |
| V14 | <i>hlyA</i> + / <i>aer</i> + / <i>act</i> + / <i>alt</i> + / <i>ast</i> - / <i>fla</i> + | 0 | 2 (1,6) | 2 (1,3) | 4 (1,3) |
| V15 | <i>hlyA</i> - / <i>aer</i> + / <i>act</i> - / <i>alt</i> - / <i>ast</i> - / <i>fla</i> - | 0 | 1 (0,8) | 2 (1,3) | 3 (1,0) |
| V16 | <i>hlyA</i> - / <i>aer</i> + / <i>act</i> + / <i>alt</i> + / <i>ast</i> - / <i>fla</i> - | 0 | 0 | 3 (1,9) | 3 (1,0) |
| V17 | <i>hlyA</i> - / <i>aer</i> - / <i>act</i> + / <i>alt</i> + / <i>ast</i> - / <i>fla</i> - | 0 | 0 | 2 (1,3) | 2 (0,7) |
| V18 | <i>hlyA</i> + / <i>aer</i> - / <i>act</i> - / <i>alt</i> - / <i>ast</i> - / <i>fla</i> - | 2 (11,8) | 0 | 0 | 2 (0,7) |
| V19 | <i>hlyA</i> + / <i>aer</i> - / <i>act</i> + / <i>alt</i> + / <i>ast</i> + / <i>fla</i> - | 0 | 1 (0,8) | 1 (0,6) | 2 (0,7) |
| V20 | <i>hlyA</i> - / <i>aer</i> - / <i>act</i> - / <i>alt</i> + / <i>ast</i> - / <i>fla</i> - | 0 | 1 (0,8) | 0 | 1 (0,3) |
| V21 | <i>hlyA</i> - / <i>aer</i> - / <i>act</i> + / <i>alt</i> + / <i>ast</i> - / <i>fla</i> + | 0 | 1 (0,8) | 0 | 1 (0,3) |
| V22 | <i>hlyA</i> - / <i>aer</i> - / <i>act</i> + / <i>alt</i> + / <i>ast</i> + / <i>fla</i> - | 0 | 1 (0,8) | 0 | 1 (0,3) |
| V23 | <i>hlyA</i> - / <i>aer</i> + / <i>act</i> + / <i>alt</i> + / <i>ast</i> + / <i>fla</i> - | 0 | 1 (0,8) | 0 | 1 (0,3) |
| V24 | <i>hlyA</i> - / <i>aer</i> + / <i>act</i> + / <i>alt</i> + / <i>ast</i> + / <i>fla</i> + | 0 | 0 | 1 (0,6) | 1 (0,3) |
| V25 | <i>hlyA</i> + / <i>aer</i> - / <i>act</i> - / <i>alt</i> + / <i>ast</i> - / <i>fla</i> + | 0 | 0 | 1 (0,6) | 1 (0,3) |
| V26 | <i>hlyA</i> + / <i>aer</i> + / <i>act</i> - / <i>alt</i> - / <i>ast</i> - / <i>fla</i> + | 1 (5,9) | 0 | 0 | 1 (0,3) |
| V27 | <i>hlyA</i> + / <i>aer</i> + / <i>act</i> - / <i>alt</i> + / <i>ast</i> - / <i>fla</i> + | 0 | 1 (0,8) | 0 | 1 (0,3) |
| V28 | <i>hlyA</i> + / <i>aer</i> + / <i>act</i> - / <i>alt</i> + / <i>ast</i> + / <i>fla</i> - | 0 | 1 (0,8) | 0 | 1 (0,3) |
| V29 | <i>hlyA</i> + / <i>aer</i> + / <i>act</i> - / <i>alt</i> + / <i>ast</i> + / <i>fla</i> + | 0 | 1 (0,8) | 0 | 1 (0,3) |
| V30 | <i>hlyA</i> + / <i>aer</i> + / <i>act</i> + / <i>alt</i> + / <i>ast</i> - / <i>fla</i> - | 0 | 1 (0,8) | 0 | 1 (0,3) |
| Total | | 17 (100) | 124 (100) | 159 (100) | 300 (100) |

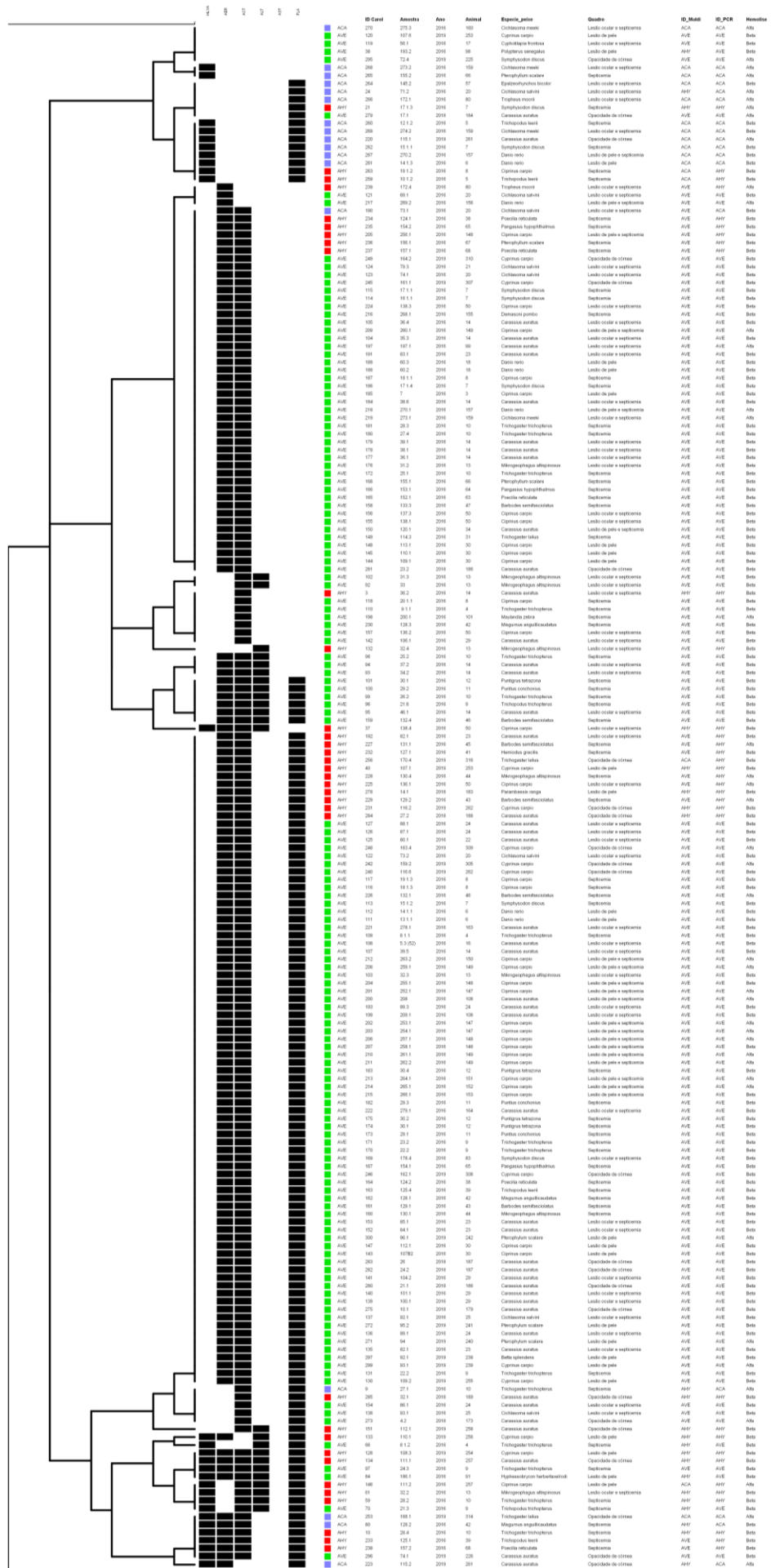


Figura 5: Dendrograma dos perfis de virulência identificados para as estirpes estudadas (Parte 1).

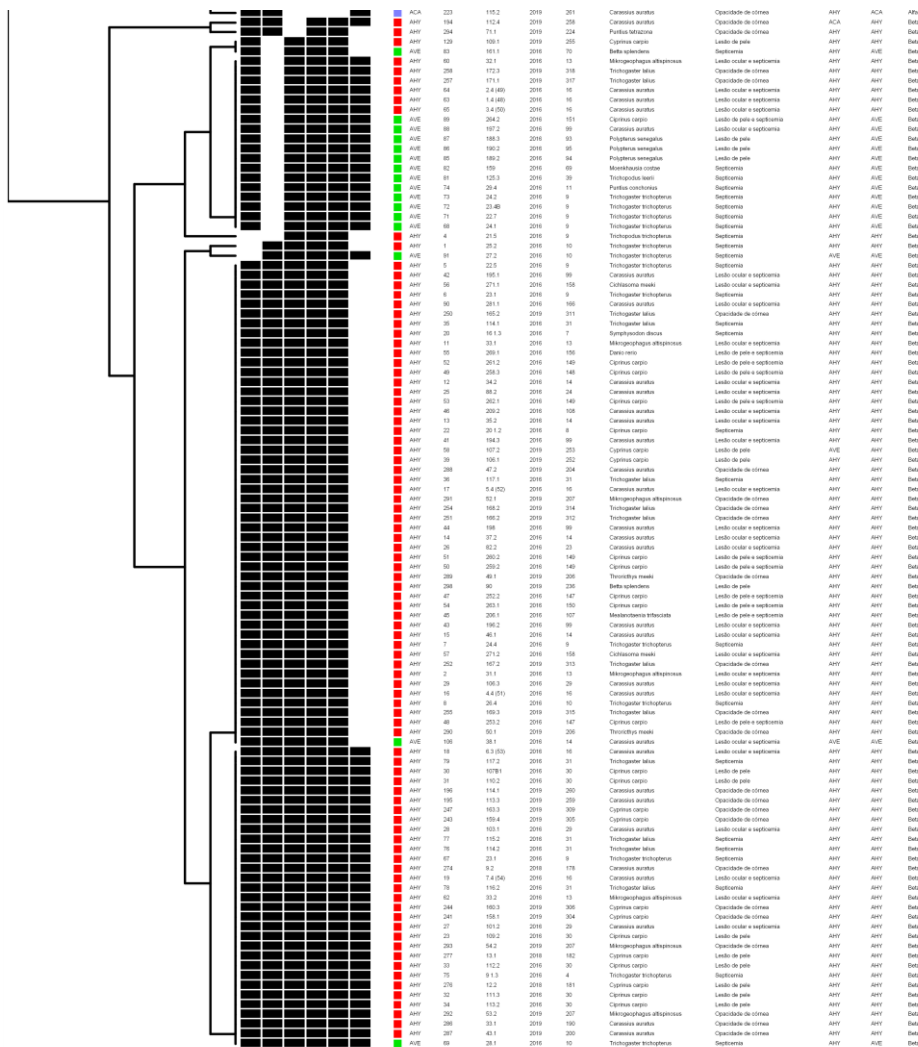


Figura 6: Dendrograma dos perfis de virulência identificados para as estirpes estudadas. (Parte 2)

A análise do SE-AFLP foi realizada separadamente para cada espécie de *Aeromonas*. O dendrograma da análise dos genótipos de *A. hydrophila* (Figura 7) possibilitou a identificação de 66 perfis genéticos (H1 – H66) dentre as 124 estirpes estudadas. Não foi observada correlação direta entre os genótipos e a origem das estirpes ou perfil de virulência; porém destacam-se: (1) perfis clonais relacionados a diferentes colônias ou amostras do mesmo animal (H13, H38, H43, H40, H43, H51); (2) perfis clonais compostos por diferentes animais da mesma espécie de um surto de aeromonose com o mesmo ou distintos sinais clínicos (H1, H9, H23, H34, H56); (3) perfis clonais compostos por animais de diferentes espécies de um surto de aeromonose (compartilhando aquário ou fonte de água) com o mesmo ou distintos sinais clínicos (H4, H5, H11, H33, H65).

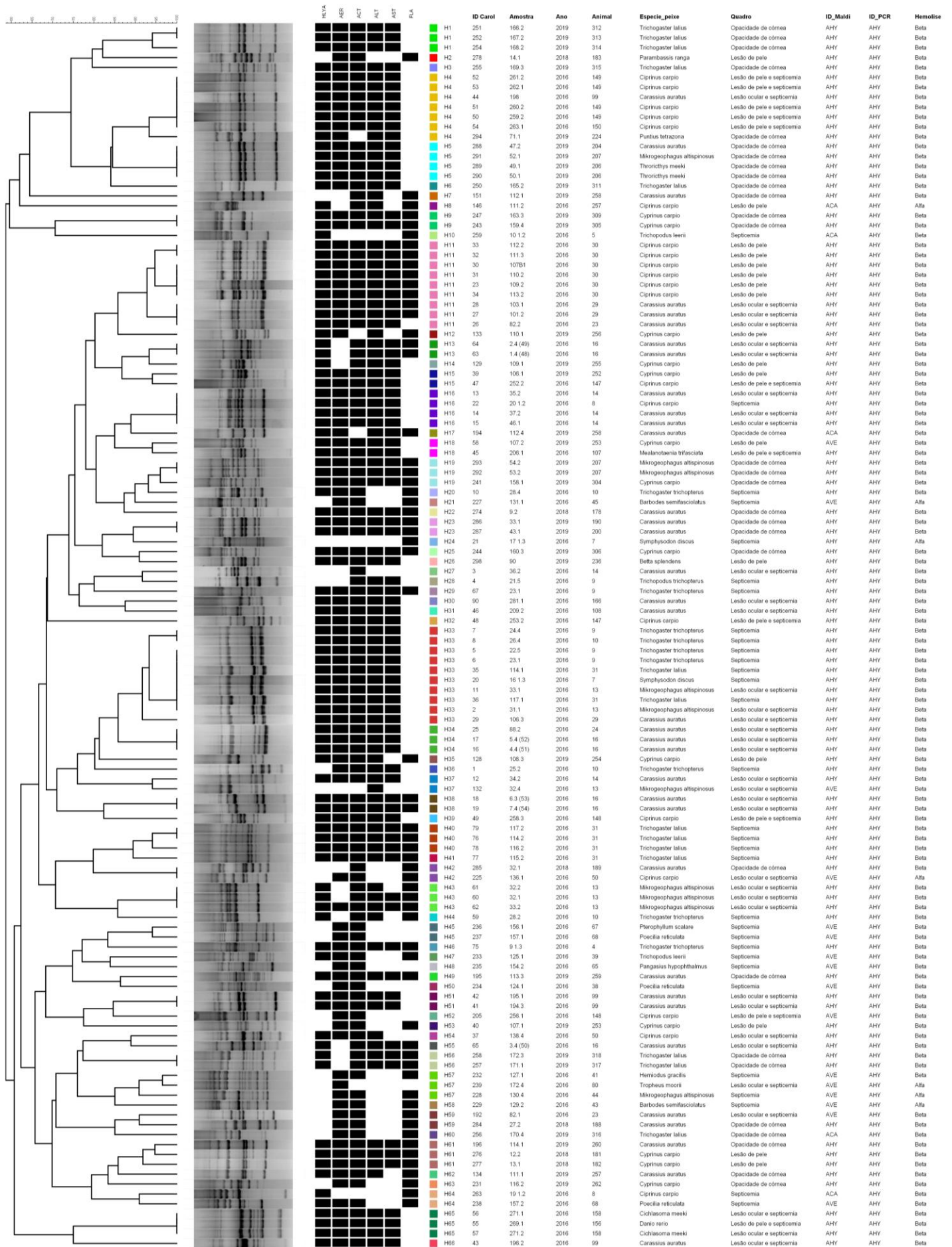


Figura 7: Dendrograma dos perfis genéticos de SE-AFLP identificados para as estirpes de *A. hydrophila*.

O dendrograma da análise dos genótipos de *A. veronii* (Figura 8) possibilitou a identificação de 118 perfis genéticos (V1 – V118) dentre as 159 estirpes estudadas, evidenciando grande heterogeneidade da espécie. De forma semelhante aos genótipos de *A. hydrophila*, são observados perfis genéticos de *A. veronii* compostos por diferentes animais da mesma espécie assim como perfis clonais compostos por animais de diferentes espécies, porém as estirpes de *A. veronii* apresentam maior diferença ou distância de tempo de isolamento quando comparadas as estirpes de *A. hydrophila*.

Em relação a espécie *A. caviae*, foram identificados 14 genótipos de SE-AFLP (C1 – C14) para as 17 estirpes estudadas, também evidenciando maior variabilidade da espécie quando comparada a *A. hydrophila*. Neste caso foram identificados apenas dois perfis clonais: C13 composto por duas colônias do kinguio A261, e C14 composto por três animais de espécies diferentes de um surto de aeromonose. De forma semelhante as demais espécies estudadas, não foram observadas associação entre os genótipos e os perfis de virulência identificados.



Figura 9: Dendrograma dos perfis genéticos de SE-AFLP identificados para as estirpes de *A. caviae*.

Em relação à caracterização do perfil de resistência aos antimicrobianos, esta foi realizada para 234 estirpes (78,0%) pois 66 estirpes não foram recuperadas no processo de reativação para a realização da técnica de disco-difusão. Das estirpes recuperadas, 15 (6,4%) eram *A. caviae*, 77 (32,9%) *A. hydrophila* e 142 (60,7%) *A. veronii*.

Na Tabela 8 é apresentada a distribuição de frequência dos perfis de resistência identificados. Dentre os 16 antimicrobianos avaliados, sulfonamida e sulfametoxazol-tripmetropim apresentaram, respectivamente, 92,7% e 50,4% de taxa de resistência. Já eritromicina, imipenem e ciprofloxacina apresentaram 74,8%, 41,9% e 38,0% das estirpes com resultado intermediário. Susceptibilidade foi observada principalmente para as cefalosporinas (todas avaliadas apresentaram mais de 75% de sensibilidade), aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina com 86,8% e 79,5% de sensibilidade, respectivamente), clorafenicol e piperacilina-tazobactam com mais de 88% de sensibilidade.

Para enrofloxacin, florfenicol e gentamicina, os resultados a partir dos pontos de corte epidemiológicos (ECOFF) são apresentados na Tabela 9; nota-se predomínio de estirpes não selvagens (NWT) para os três antimicrobianos.

Tabela 8: Distribuição de frequência dos perfis de resistência identificados – N (%).

| Antimicrobiano | Sensível | Intermediário | Resistente | Total |
|------------------------------------|-----------------|----------------------|-------------------|--------------|
| Cefoxitina | 228 (97,4) | 3 (1,3) | 3 (1,3) | 234 (100) |
| Ceftazidima | 198 (84,6) | 28 (12,0) | 8 (3,4) | 234 (100) |
| Ceftriaxona | 214 (91,5) | 16 (6,8) | 4 (1,7) | 234 (100) |
| Cefepima | 179 (76,5) | 50 (21,4) | 5 (2,1) | 234 (100) |
| Imipenem | 102 (43,6) | 98 (41,9) | 34 (14,5) | 234 (100) |
| Piperacilina-tazobactam | 207 (88,5) | 18 (7,7) | 9 (3,8) | 234 (100) |
| Clorafenicol | 208 (88,9) | 22 (9,4) | 4 (1,7) | 234 (100) |
| Florfenicol | 107 (45,7) | 49 (20,9) | 78 (33,4) | 234 (100) |
| Tetraciclina | 172 (73,5) | 36 (15,4) | 26 (11,1) | 234 (100) |
| Ciprofloxacina | 110 (47,0) | 89 (38,0) | 35 (15,0) | 234 (100) |
| Enrofloxacina | 34 (14,5) | 119 (50,9) | 81 (34,6) | 234 (100) |
| Sulfonamida | 8 (3,4) | 9 (3,9) | 217 (92,7) | 234 (100) |
| Sulfametoxazol-tripmetropim | 98 (41,9) | 18 (7,7) | 118 (50,4) | 234 (100) |
| Eritromicina | 5 (2,1) | 175 (74,8) | 54 (23,1) | 234 (100) |
| Gentamicina | 203 (86,8) | 21 (9,0) | 10 (4,2) | 234 (100) |
| Amicacina | 186 (79,5) | 33 (14,1) | 15 (6,4) | 234 (100) |

Tabela 9: Distribuição de frequência dos perfis de resistência identificados – N (%).

| Classificação | Florfenicol | Gentamicina | Enrofloxacina |
|----------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| WT | 75 (32,1) | 108 (46,2) | 0 |
| NWT | 159 (67,9) | 126 (53,8) | 234 (100) |
| Sensível | 107 (45,7) | 203 (86,7) | 34 (14,5) |
| Intermediário | 49 (20,9) | 21 (9,0) | 119 (50,9) |
| Resistente | 78 (33,4) | 10 (4,3) | 81 (34,6) |

Multirresistência foi detectada em 82,5% das estirpes estudadas (Tabela 10); destacam-se as estirpes de *A. caviae* com 100% de multirresistência, *A. hydrophila* com 90,9% e *A. veronii* com 76,0%. A distribuição dos resultados do antibiograma segundo as espécies de *Aeromonas* estudadas é apresentada na Figura 10. Não foi observada diferença dentre os perfis de resistência para as espécies de *Aeromonas* estudadas.

Tabela 10: Distribuição de frequência do número de classes de antimicrobianos resistentes segundo as espécies de *Aeromonas* – N (%).

| Nº de classes | <i>A. caviae</i> | <i>A. hydrophila</i> | <i>A. veronii</i> | Total |
|----------------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------|
| 1 a 2 | 0 | 7 (9,1) | 34 (24,0) | 41 (17,5) |
| 3 a 5 | 10 (66,7) | 51 (66,2) | 104 (73,2) | 165 (70,5) |
| 6 a 8 | 5 (33,3) | 19 (24,7) | 4 (2,8) | 28 (12,0) |
| Total | 15 (100) | 77 (100) | 142 (100) | 234 (100) |

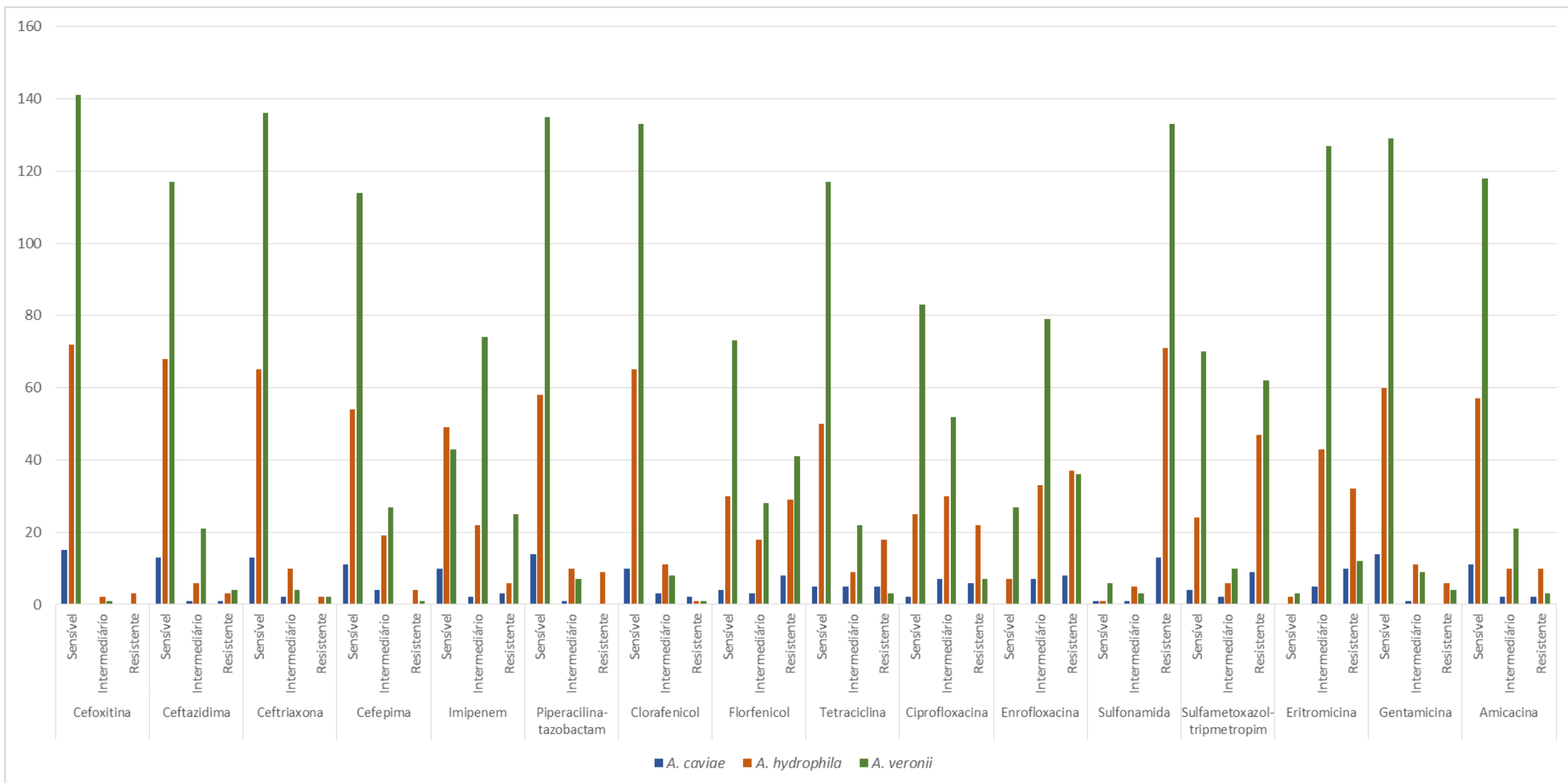


Figura 10: Gráfico representativo da distribuição dos resultados de antibiograma observados segundo as espécies de *Aeromonas*.

6. DISCUSSÃO

As bactérias do gênero *Aeromonas* ocasionam elevada mortalidade e grandes perdas econômicas no setor da aquicultura (TOMÁS, 2012). Integrantes da microbiota de peixes e ambientes aquáticos, essas bactérias estão associadas à doença principalmente em peixes criados em viveiros ou em sistemas de reaproveitamento de água e situações de estresse e manejo inadequado (SMITH et al., 2012). Considerando a importância financeira e sanitária da aeromonose na aquicultura, a detecção rápida e confiável das espécies do gênero *Aeromonas* é de grande interesse para o setor.

Tradicionalmente, a identificação bacteriana pode ser realizada tanto por métodos fenotípicos quanto genotípicos, de modo que o objetivo final é a utilização de uma técnica rápida e confiável para ser empregada na rotina de identificação microbiológica (POPOVIĆ et al., 2017).

Há mais de 20 anos a taxonomia do gênero *Aeromonas* é atualizada em decorrência da aplicação de técnicas moleculares e análises filogenéticas; essas análises genotípicas apresentam discordâncias consideráveis da tradicional identificação fenotípica (BEAZ-HIDALGO et al., 2010). Dessa forma, a correta identificação dessas bactérias ao nível de espécie ainda é um desafio para a maioria dos laboratórios de microbiologia clínica (FIGUERAS, 2005).

Recentemente, a espectrometria de massa MALDI-TOF foi considerada uma técnica alternativa para a identificação de estirpes de *Aeromonas* (LAMY; KODJO; LAURENT, 2011). A espectrometria de massa MALDI-TOF apresenta alta precisão e rapidez em seus resultados; entretanto, por ser uma técnica dependente de isolamento bacteriano prévio, esta pode apresentar variações das espécies

identificadas em decorrência dos meios de cultura e condições de crescimento empregado (POPOVIĆ et al., 2017).

Além disso, considerando que a técnica se fundamenta principalmente na detecção e diferenciação de picos de proteínas ribossomais, sabe-se que MALDI-TOF MS apresenta limitação para distinguir espécies muito próximas devido à alta similaridade da composição ribossomal (VÁVROVÁ et al., 2015).

Esta situação já foi relatada para os gêneros *Aeromonas* e *Edwardisella*, que possuem baixa especificidade na identificação de espécies pela espectrometria de massa MALDI-TOF, em decorrência da baixa heterogeneidade da composição ribossomal (VÁVROVÁ et al., 2015; POPOVIĆ et al., 2017; PÉREZ-SANCHO et al., 2018). Apesar disso, a técnica ainda pode ser utilizada na rotina diagnóstica com resultados confiáveis para identificação de gênero.

Condição semelhante é observada na utilização do sequenciamento do gene 16S rDNA para diferenciação das espécies de *Aeromonas*. Devido à baixa heterogeneidade das sequências ribossomais, a filogenia pelo gene 16S rDNA também se torna pouco confiável (MORANDI et al., 2005; JANDA; ABBOTT, 2007). Dessa forma, é necessário utilizar outros genes *housekeeping*, como *rpoB*, *rpoD* e *gyrB*, na identificação genotípica das espécies do gênero *Aeromonas* (SOLER et al., 2004; LAMY; LAURENT; KODJO, 2010).

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram as informações descritas acima. Apesar de MALDI-TOF MS apresentar boa concordância com a identificação genotípica realizada, foi observado que em mais de 90% das estirpes estudadas a técnica resultou em mais de um “*match*” de identificação para duas espécies diferentes de *Aeromonas*, dentre as três detectadas, com escores ≥ 2.0 . Dessa forma, apesar de agilizar o diagnóstico, o resultado da espectrometria de

massa também suscita dúvida para adequada atribuição de espécies dentro do gênero *Aeromonas*.

Vale ressaltar também, que foram observadas discrepâncias pontuais entre as técnicas (MALDI-TOF MS e PCR) na identificação das três espécies de *Aeromonas*, apesar de não ser detectada diferença significativa entre elas e apresentaram boa concordância pelo coeficiente de *Kappa*. Portanto, propõe-se a utilização da espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação de estirpes de *Aeromonas* apenas a nível de gênero, e posterior confirmação genotípica das respectivas espécies.

No presente estudo, todas as espécies de peixes avaliados eram originárias de água doce e de um sistema de criação caracterizado por recirculação de água e manejo intensivo. Em relação aos perfis de infecção detectados, considerando a combinação das espécies *A. veronii*, *A. hydrophila* e *A. caviae*, demanda atenção que 23,6% dos animais avaliados apresentaram co-infecção de *A. veronii* e *A. hydrophila* (perfil P4).

Outro dado importante observado com a análise dos perfis de infecção é o fato de, juntos, os perfis P1 (AVE), P2 (AHY) e P3 (ACA) serem responsáveis por 67,5% das estirpes de *Aeromonas* isoladas dos 123 peixes do estudo, demonstrando que mais da metade dos animais foram acometidos por uma única espécie de *Aeromonas*.

As espécies de *Aeromonas* muitas vezes irão causar danos aos hospedeiros após uma injúria ou estresse sofrido (CHEN et al., 2019). Janda e Abbott (2010) estudando ao longo de décadas o gênero *Aeromonas*, relataram que as espécies comumente isoladas de casos clínicos envolvendo infecções extra-intestinais e sistêmicas em humanos são *A. hydrophila*, *A. veronii* e *A. caviae*. Em nossa

pesquisa envolvendo estirpes de *Aeromonas* isoladas de peixes ornamentais encontramos o mesmo tipo de espécies acometendo tais animais.

Durante muito tempo *A. hydrophila* era o principal agente encontrado em peixes doentes; porém recentemente os relatos envolvendo *A. veronii* têm aumentado (CHEN et al., 2019). Corroborando com esse recente incremento de casos relacionados com *A. veronii*, 53,0% (159/300) das estirpes isoladas no presente estudo foram identificadas como *A. veronii*, 41,3% (124/300) como *A. hydrophila*, e 5,7% (17/300) restante como *A. caviae*.

Em relação às características hemolíticas das estirpes de *Aeromonas*, estas podem apresentar dois tipos de hemolisinas sem propriedades enterotóxicas: α -hemolisinas e β -hemolisinas, responsáveis pela lise osmótica dos eritrócitos (TOMÁS, 2012). Năcescu et al. (1992) foram os primeiros a propor uma associação entre a atividade hemolítica das estirpes de *Aeromonas* e o seu potencial patogênico.

Posteriormente, Singh e Sanyal (1992) demonstraram que estirpes β -hemolíticas de *Aeromonas* causavam maior acúmulo de fluido nas alças intestinais de coelhos infectados experimentalmente do que as estirpes α -hemolíticas e não-hemolíticas, independentemente da espécie de *Aeromonas*.

Apesar de não haver uma relação clara entre as espécies de *Aeromonas* e o fenótipo hemolítico, Nakano et al. (1990) já constatavam que, dentre as estirpes isoladas de ambientes aquáticos (marinhos e águas superficiais ribeirinhas), a maioria das estirpes de *A. hydrophila* eram altamente hemolíticas, enquanto apenas 11% das estirpes de *A. caviae* apresentavam fenótipo hemolítico.

Mais recentemente, em um estudo realizado no Brasil com 117 estirpes de *Aeromonas* provenientes de vegetais, água e fezes de pacientes com diarreia, Castilho et al. (2009) detectaram 100% de estirpes com fenótipo de beta-hemólise.

No presente estudo, foi observado predomínio de estirpes beta-hemolíticas para as espécies *A. veronii* e *A. hydrophila*, enquanto 52,9% das estirpes de *A. caviae* (9/17) apresentaram fenótipo de alfa-hemólise. Destaca-se que dentre as 300 estirpes analisadas, não foi observado o fenótipo de gama-hemólise (não hemolítico).

Ainda sobre o fenótipo de beta-hemólise, vale ressaltar que a atividade hemolítica de *A. caviae* pode ser regulada por fatores ambientais e de crescimento como foi relatado por Wang et al. (1996); os autores propuseram que as estirpes de *Aeromonas* apresentavam um potencial virulento, porém por uma subexpressão da toxina esta não era detectada fenotipicamente. Essa pode ser uma possibilidade para a baixa frequência de estirpes de *A. caviae* com fenótipo de beta-hemólise no presente trabalho.

O potencial patogênico de um agente pode ser caracterizado pela análise dos fatores de virulência. Sabe-se que as espécies de *Aeromonas* promovem uma doença de aspecto multifatorial no hospedeiro, onde os mecanismos de patogenicidade ainda não foram totalmente esclarecidos (CHOPRA; HOUSTON, 1999; BIZANI; BRANDELLI, 2001).

De acordo com Heuzenroeder, Wong e Flower (1999), a presença dos genes *hlyA* e *aer* nas estirpes de *A. hydrophila* as tornam mais virulentas e com capacidade de ocasionarem diarreia independente da sua origem de isolamento. Sabe-se também da possibilidade de outras citotoxinas, como a enterotoxina citotóxica (codificada pelo gene *act*), participarem da patogênese da infecção por *Aeromonas*

(WANG et al., 2003). Os resultados do presente estudo corroboram esses dados, com as estirpes de fenótipo hemolítico apresentando maior positividade para os genes *act* (241/258) e *aer* (209/258).

Em trabalho realizado no sul do Brasil com estirpes de *Aeromonas* isoladas de pacientes com gastroenterite, Guerra et al. (2007) constataram que as espécies *A. hydrophila* e *A. veronii* apresentaram mais genes de virulência quando comparadas com as estirpes de *A. caviae*. Já Castilho et al. (2009) obtiveram como resultados o gene *ast* presente em 26,5%, *alt* em 24,8%, *aer* em 58% e *hlyA* em 43,6% das estirpes brasileiras de *Aeromonas* de diferentes origens.

Resultado semelhante foi observado no presente estudo, no qual mais de 50% das estirpes de *A. hydrophila* apresentaram positividade para os genes avaliados. As estirpes de *A. veronii* apresentaram maior proporção de *aer*, *act* e *fla*, enquanto as estirpes de *A. caviae* apresentaram resultados positivos para os genes *hlyA* e *fla*. Destacou-se também a presença de cinco estirpes de *A. veronii* e *A. caviae* negativas para todos os genes estudados; em contrapartida, 31 estirpes de *A. hydrophila* foram positivas para todos os genes.

Os dados encontrados revelam que existe diferença entre as espécies de *Aeromonas* com relação à presença de genes de virulência e que as espécies podem apresentar mecanismos distintos para infectar o hospedeiro, como foi proposto também por Khor et al. (2015).

No presente estudo, as estirpes de *A. hydrophila* apresentaram maior positividade para genes de virulência quando comparadas às outras duas espécies analisadas. Apesar de não encontrarmos relação com os perfis de virulência e os quadros clínicos de origem, as estirpes isoladas nesse projeto merecem atenção

quanto ao potencial zoonótico visto que sua presença pode ser detectada em diversos ambientes que tenham contato com água.

Com relação à análise do SE-AFLP, no presente estudo não foi observada correlação direta entre os genótipos e a origem ou perfil de virulência das estirpes de *Aeromonas*. Isto se distingue do que foi relatado por Lund et al. (2002) que observaram que os agrupamentos de perfis genéticos indicavam uma relação entre a similaridade genética dos isolados e a espécie do hospedeiro, e também por Pablos et al. (2011) que conseguiram correlacionar a transmissão de *A. caviae* por água contaminada e doença em humanos através da genotipagem.

Entretanto, nossos achados demonstram que as estirpes de *Aeromonas* possuem grande variabilidade genética, destacando-se as estirpes de *A. caviae*, na quais foram identificados 14 genótipos para as 17 estirpes estudadas. Para as estirpes de *A. veronii*, também notamos importante heterogeneidade genética, sendo identificados 118 perfis genéticos dentre as 159 estirpes estudadas. Já para as 124 estirpes de *A. hydrophila*, encontramos 66 perfis genéticos.

Esses resultados estão de acordo com os relatos de Millership e Want (1993), que afirmam existir, dentro do gênero *Aeromonas*, muitos grupos de hibridização e fenótipos, demonstrando a grande heterogeneidade do grupo. Além disso, nossos achados podem ter relação com a grande variedade de espécies de peixes presentes neste estudo, assim como as diferentes origens desses animais já que são provenientes de diversos criadores.

Relatado por Pessoa et al. (2019) como um problema de saúde pública, a troca de informações genéticas entre as bactérias do gênero *Aeromonas* possibilita o surgimento de cepas multirresistentes aos antimicrobianos; além disso, o meio aquático recebe diariamente efluentes urbanos e industriais contendo resíduos

medicamentosos que irão favorecer o surgimento de cepas mais virulentas e resistentes aos antimicrobianos comerciais.

No presente estudo, 16 antibióticos de interesse veterinário e humano foram avaliados; as classes incluídas foram: anfenicóis (clorafenicol e florfenicol), tetraciclina (tetraciclina), cefalosporinas (cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona e cefepima), carbapenêmicos (imipinem), fluorquinolonas (ciprofloxacina e enrofloxacina), aminoglicosídeos (gentamicina e amicanina), macrolídeos (eritromicina), sulfonamidas (sulfonamida e sulfametoxazol-tripmetropim), beta-lactâmico com inibidor de beta-lactamase (piperacilina-tazobactam).

As maiores taxas de resistência foram detectadas para sulfonamida e sulfametoxazol-tripmetropim, ambas apresentando mais de 50% de resistência. Já eritromicina, imipenem e ciprofloxacina apresentaram mais de 38,0% das estirpes com resultado intermediário; enquanto as cefalosporinas, os aminoglicosídeos, o clorafenicol e a piperacilina-tazobactam se destacaram com mais de 75% de sensibilidade.

Segundo Zhu et al. (2017) a enrofloxacina é um dos principais antimicrobianos utilizados na aquicultura e, apesar de sua alta potência, recentemente estirpes de *Aeromonas* tem apresentando resistência a esse antimicrobiano da classe das fluorquinolonas.

Nossos resultados estão de acordo com esse relato de Zhu et al. (2017), destacando-se com 34,6% de resistência e 50,9% de susceptibilidade intermediária para enrofloxacina nas 234 estirpes submetidas às análises. Esse dado é importante pois demonstra que mesmo não tendo seu uso licenciado para animais aquáticos no Brasil, a utilização indiscriminada da enrofloxacina está promovendo um aumento da

resistência nas estirpes de *Aeromonas*. Além disso, esse dado expressa a necessidade de mais estudos envolvendo antimicrobianos e ambientes aquáticos.

O aumento nos casos de resistência ao florfenicol já foi relatado por Zhao et al. (2018), sendo relacionado ao uso crescente e indevido do antimicrobiano em ambientes aquáticos. Entretanto, o uso de mio-inositol em associação aumentou a eficácia do florfenicol como foi relatado pelo mesmo grupo. Em nosso trabalho encontramos uma taxa de resistência de 33,4% e susceptibilidade intermediária de 20,9% para este antimicrobiano, demonstrando que seu uso precisa ser mais racional e controlado, visto que esses resultados demonstram que em um futuro próximo, encontraremos *Aeromonas* com altos níveis de resistência por de ser um dos antimicrobianos licenciados para uso em peixes ornamentais.

As tetraciclinas, por sua vez, são mundialmente utilizadas no tratamento de animais provenientes de ambientes aquáticos, sendo seu uso permitido em países como Estados Unidos da América, República Tcheca, Coreia e Japão (HOSSAIN; HEO, 2021). No Brasil, seu uso, juntamente com o florfenicol, é licenciado para a piscicultura (SINDAN, 2018).

Diante disso, a detecção de 73,5% de sensibilidade para tetraciclina no presente estudo demonstra que esse continua sendo um antimicrobiano de boa escolha para peixes ornamentais. Sharma et al. (2022) também relataram sensibilidade para tetraciclina em estirpes de *Aeromonas* provenientes de *Clarias magur*, uma espécie de peixe nativa do sudeste asiático. No entanto, Hossain et al. (2019), detectaram mais de 70% de resistência para tetraciclina em peixes da espécie *Danio rerio* (peixe-zebra) na Coreia do Sul. Dessa forma, por se tratar de um importante antimicrobiano para a piscicultura, a utilização de tetraciclinas deve ser monitorada inclusive nas criações ornamentais.

Em relação a eritromicina e imipenem, tratam-se de antimicrobianos com potencial para tratamentos em humanos. Dhanapala et al. (2021), em estudo com peixes ornamentais no Sri Lanka, encontraram resistência para eritromicina em 26,1% das 161 estirpes de *Aeromonas* e 18% para imipenem. Esses resultados corroboram os do presente estudo, no qual foram observadas taxas de 23,1% de resistência à eritromicina e 14,5% para imipenem; no entanto destacam-se os resultados de 74,8% e 41,9% de susceptibilidade intermediária para esses antimicrobianos já indicando incremento de sua resistência num futuro próximo.

Batra, Mathur e Misra (2016) descrevem algumas cepas de bactérias do gênero *Aeromonas* com sensibilidade aos antimicrobianos das classes dos aminoglicosídeos, tetraciclinas, anfenicóis, quinolonas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e à piperacilina. No presente estudo encontramos sensibilidade acima de 76,5% para todos os antimicrobianos das classes dos aminoglicosídeos e cefalosporinas testados, corroborando com os dados informados. A combinação piperacilina-tazobactam apresentou 88,5% de sensibilidade, estando de acordo também. Entretanto, dentro da classe dos anfenicóis, somente o cloranfenicol apresentou boa sensibilidade (88,9%) para as estirpe de *Aeromonas* avaliadas.

Ao analisarmos os dados de WT e NWT podemos verificar, respectivamente, a ausência ou presença de resistência adquirida e mecanismos mutacionais para o antimicrobiano em estudo (BARON et al, 2017). Nossos resultados demonstram que as estirpes de *Aeromonas* do presente estudo estão classificadas em mais de 50% como NWT e sendo assim, sua resistência aos antimicrobianos (enrofloxacin, florfenicol e gentamicina) está relacionada com uma resistência adquirida.

Com relação à multirresistência, esta foi detectada em 82,5% das estirpes estudadas; destacam-se as estirpes de *A. caviae* com 100% de multirresistência, *A. hydrophila* com 90,9% e *A. veronii* com 76,0%. Hossain e Heo (2021) também relataram resultado parecido, no qual foi detectada multiresistência acima de 70% nas estirpes estudadas; os autores alertam para a crescente resistência aos antimicrobianos e sua associação ao uso indevido e indiscriminado para animais aquáticos, especialmente peixes ornamentais.

Os resultados encontrados no presente estudo demonstram a importância das *Aeromonas*, principalmente pelo fato dessa bactéria poder causar doença em animais e humanos e por apresentar altas taxas de resistência aos antimicrobianos. Melhorias em manejo e criação de peixes ornamentais devem ser praticadas para reduzir a necessidade de tratamentos medicamentosos; e nos casos necessários, o uso consciente de antimicrobianos aprovados para veterinária é essencial para evitar maior disseminação de resistência e comprometimento de antimicrobianos utilizados no tratamento de humanos.

7.CONCLUSÕES

- Todas as estirpes de *Aeromonas* spp. foram identificadas pelas técnicas de MALDI-TOF MS e PCR; não foi detectada diferença significativa entre as técnicas que apresentaram ainda boa concordância.
- Foi constatado que a técnica de MALDI-TOF MS suscita dúvida para adequada atribuição de espécie dentro do gênero *Aeromonas*, sendo a PCR a técnica escolhida para continuidade do estudo;
- Foi observada variação na distribuição de frequência dos seis genes de virulência pesquisados nas diferentes espécies de *Aeromonas*, com destaque para as estirpes de *A. hydrophila* que apresentaram maior positividade para genes de virulência sugerindo maior potencial de virulência, corroborando os dados da literatura.
- Não foi observada relação entre os perfis de virulência e os quadros clínicos ou animais de origem.
- A análise de SE-AFLP evidenciou maior heterogeneidade das espécies *A. veronii* e *A. caviae* comparadas à *A. hydrophila*; porém, não foi observada relação direta entre os genótipos e a origem das estirpes ou perfil de virulência diferentemente do que foi encontrado na literatura.
- Em relação à caracterização do perfil de resistência aos antimicrobianos, sulfonamida e sulfametoxazol-tripmetropim apresentaram mais de 50% de taxa de resistência, apesar de não serem antimicrobianos autorizados para uso na piscicultura.

- A alta taxa de multirresistência detectada (82,5%), destacando-se as estirpes de *A. caviae* com 100% de multirresistência e *A. hydrophila* com 90,9%, corrobora a literatura e demanda atenção para o risco de disseminação da resistência não apenas no ambiente aquático, mas também para o potencial comprometimento do tratamento em humanos.

REFERÊNCIAS

- ABINPET. **Mercado pet Brasil**, 2022. Disponível em: https://abinpet.org.br/wp-content/uploads/2022/08/abinpet_folder_dados_mercado_2022_draft3_web.pdf. Acesso em: 07 de setembro de 2022
- AGUILERA-ARREOLA, M.; RODRÍGUEZ, C.H.; ZÚÑIGA, G.; FIGUERAS, M.J.; CASTRO-ESCARPULLI, G. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. **FEMS Microbiology Letters**, v.242, n.2, p.231-240, 2005.
- ALEEM, M.; AZEEM, A.R.; RAHMATULLAH, S.; VOHRA, S.; NASIR, S.; ANDLEEB, S. Prevalence of bacteria and antimicrobial resistance genes in hospital water and surfaces. **Cureus**, v.13, n.10, e18738, 2021.
- ALMEIDA, A.F. *Aeromonas e Plesiomonas*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2015. p.383-387.
- ALPERI, A.; FIGUERAS, M. Human isolates of *Aeromonas* possess Shiga toxin genes (stx1 and stx2) highly similar to the most virulent gene variants of *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.16, n.10, p.1563–1567, 2010.
- ANJUR, N.; SABRAN, S.F.; DAUD, H.M.; OTHMAN, N.Z. An update on ornamental fish industry in Malaysia: *Aeromonas hydrophila*- associated disease and its treatment control. **Veterinary world**, v.14, n.5, p.1143-1152, 2021.
- AWAN, M.B.; MAQBOOL, A.; BARI, A.; KROVACEK, K. Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* spp. isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates. **New Microbiologia**, n.32, p.17-23, 2009.
- BARKER, G. Bacterial diseases. In: WILDGOOSE, W.H. **BSVA Manual of ornamental fish**. London: British Small Animal Veterinary Association, 2001. cap. 22, p.185-193.
- BARON, S.; GRANIER, S.A.; LARVOR, E.; JOUY, E.; CINEUX, M.; WILHELM, A.; GASSILLOUD, B.; LE BOUQUIN, S.; KEMPF, I.; CHAUVIN, C. *Aeromonas* diversity and antimicrobial susceptibility in freshwater—an attempt to set generic epidemiological Cut-Off values. **Frontiers Microbiology**, v.8, 503, pages 9, 2017.
- BARRETT, T.J.; -SMIDT, P.G.; Swaminathan, B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.3, n.1, p.20-31, 2006.
- BATRA, P.; MATHUR, P.; MISRA, M.C. *Aeromonas* spp.: an emerging nosocomial pathogen. **Journal of Laboratory Physicians**, v.8, p.1-4, 2016.
- BEAZ-HIDALGO, R.; ALPERI, A.; BUJÁN, N.; ROMALDE, J.L.; FIGUERAS, M.J. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, n.3 p.149-153, 2010.
- BEAZ-HIDALGO, R.; FIGUERAS, M.J. *Aeromonas* spp whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. **Journal of Fish Disease**, v.36, p.371-388, 2013.
- BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.334-339, 2001.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; VAN DILLEN, P.M.E.W.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.3, p.495-503, 1990.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Diretriz nacional para elaboração de programa de gerenciamento do uso de antimicrobianos em serviços de saúde**. Brasília, DF, 28 de dezembro de 2017.

BUCHANAN, R.L.; PALUMBO, S.A. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. **Journal of Food Safety**, v.7, p.15-29, 1985.

BURKE, V.; ROBINSON, J.; PETERSON, D.; PARTRIDGE, K. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. **Applied Environmental Microbiology**, v.48, n.2, p.231–236, 1984.

CARDOSO, P.H.M. **O sistema APPCC como delineamento técnico para criação e implementação de programas de autocrontole sanitário em estabelecimentos atacadistas de peixes ornamentais**. 2017. 178f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 2017.

CARDOSO, P.H.M.; MORENO, L.Z.; OLIVEIRA, C.H.; GOMES, V.T.M.; SILVA, A.P.S.; BARBOSA, M.R.F.; SATO, M.I.Z.; BALIAN, S.C.; MORENO, A.M. Main bacterial species causing clinical disease in ornamental freshwater fish in Brazil. **Folia Microbiologica**, v.66, p.231-239, 2021.

CASTILHO, M.C.B.; CASTRO, T.L.A.; ARAÚJO, V.S. TRAJANO, R.S.; SANTOS, P.A.; PIMENTA, P.M.C.; LUCHEZE, K.; MELO, J.T.B.; GONÇALVES, A.M.; NOGUEIRA, R.T.; LUNA, M.G.; FREITAS-ALMEIDA, A.C. High frequency of hemolytic and cytotoxic activity in *Aeromonas* spp. Isolated from clinical, food and environmental in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.96, p.53-61, 2009.

CHAURET, C.; VOLK, C.; CREASON, R.; JAROSH, J.; ROBINSON, J.; WARNES, C. Detection of *Aeromonas hydrophila* in a drinking-water distribution system: a field and pilot study. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, n.8, p.782-786, 2001.

CHEN, F.; SUN, J.; HAN, Z.; YANG, X.; XIAN, J.; LV, A.; HU, X.; SHI, H. Isolation, identification and characteristics of *Aeromonas veronii* from diseased crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). **Frontiers in Microbiology**, v.10, 10 pages, 2019.

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

CLSI, 2020. Performances standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, Second Information Supplement. **VET01-S2. CLSI**, Wayne, PA, USA.

CLSI, 2020. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Second Informational Supplement. **CLSI guideline VET03VET04S1E. CLSI**, Wayne, PA, USA.

CLSI, 2020. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria, 3rd ed. **CLSI guideline M45. CLSI**, Wayne, PA, USA.

DHANAPALA, P.M.; KALUPAHANA, R.S.; KALUPAHANA, A.W.; WIJESEKERA, D.P.H.; KOTTAWATTA, S.A.; JAYASEKERA, N.K.; SILVA-FLETCHER, A.; JAGODA, S.S.S.S. Characterization and antimicrobial resistance of environmental and clinical *Aeromonas*

- species isolated from fresh water ornamental fish and associated farming environment in Sri Lanka. **Microorganisms**, v.9, n.10, 2106, 2021.
- EDBERG, S.C.; BROWNE, F.A.; ALLEN, M.J. Issues for microbial regulation: *Aeromonas* as a model. **Critical Reviews in Microbiology**, v.33, p.89-100, 2007.
- EL-BAHAR, H.M.; ALI, N.G.; ABOYADAK, I.M.; KHALIL, S.A.E.S.; IBRAHIM, M.S. Virulence genes contributing to *Aeromonas hydrophila* pathogenicity in *Oreochromis niloticus*. **International Microbiology**, v.22, p.479-490, 2019.
- FERNÁNDEZ-BRAVO, A.; FIGUERAS, M.J. An update on the genus *Aeromonas*: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. **Microorganisms**, v.8, n.129, p.39, 2020.
- FIGUEIREDO, H.C.P.; CASTRO, G.A.C.; LEAL, C.A.G.; LOPES, C.O. Quem tem medo de *Aeromonas*? **Panorama da Aquicultura**, v.18, n.108, p.26-31, 2008.
- FIGUERAS, M.J. Clinical relevance of *Aeromonas*. **Reviews in Medical Microbiology**, v.16, n.4, p.145-153, 2005.
- GUERRA, I.M.F.; FADANELLI, R.; SCHREINER, F.; DELAMARE, A.P.L.; WOLLHEIM, C.; COSTA, S.O.P.; ECHEVERRIGARAY, S. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in South Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.638-643, 2007.
- GUO, P.; WANG, N.; LIU, Y.J.; LU, C.P. Antimicrobial susceptibility and characterization of outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* isolated in China. **Journal of Integrative Agriculture**, v.13, n.4, p.911-917, 2014.
- HEUZENROEDER, M.W.; Wong, C.Y.F.; Flower, R.L.P. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates from *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. **FEMS Microbiology Letters**, v.174, n.1, p.131-136, 1999.
- HIJAZIN, M.; ALBER, J.; LAMMLER, C.; WEITZEL, C.; HASSAN, A.A.; TIMKE, M.; KOSTRZEWA, M.; BERNINGHOFF, E.P.; ZSCHOCK, M. Identification of *Trueperella* (*Arcanobacterium*) *bernardiae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis and by species-specific PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v.61, n.3, p.457-459, 2012.
- HOLMES, P.; NICCOLLS, L.M.; SARTORY, D.P. The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. In: AUSTIN, B.; ALTWEGG, M.; GOSLING, P.J.; JOSEPH, S. **The genus *Aeromonas***. Chichester: John Wiley & Sons, 1996, p.127-150.
- HOSSAIN, S.; DAHANAYAKE, P.S.; SILVA, B.C.J.; WICKRAMANAYAKE, M.V.K.S.; WIMALASENA, S.H.M.P.; HEO, G.J. Multidrug resistant *Aeromonas* spp. isolated from zebrafish (*Danio rerio*): antibiogram, antimicrobial resistance genes and class 1 integron gene cassettes. **Letters in Applied Microbiology**, v.68, n.5, p.370-377, 2019.
- HOSSAIN, S.; HEO, G.-J. Ornamental fish: a potential source of pathogenic and multidrug-resistant motile *Aeromonas* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v.72, n.1, p.2-12, 2021.
- HOVDA, M.B.; LUNESTAD, B.T.; FONTANILLAS, R.; ROSNES, J.T. Molecular characterization of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmon salar* L.). **Aquaculture**, v.272, p.581-588, 2007.

HUYS, G.; COOPMAN, R.; JANSSEN, P.; KERSTERS, K. High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, n.2, p.572-580, 1996.

HUYS, G.; KERSTERS, I.; COOPMAN, R.; JANSSEN, P.; KERSTERS, K. Genotypic diversity among *Aeromonas* isolates recovered from drinking water production plants as revealed by AFLP analysis. **Systematic and Applied Microbiology**, v.19, n.3, p.428-435, 1996.

HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; COOPMAN, R.; JANSSEN, P.; FALSEN, E.; ALTWEEG, M.; KERSTERS, K. Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.44, n.4, p.651-658, 1994.

JANDA, J.M. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, n.4, p.397-410, 1991.

JANDA, J.M., ABBOTT, S. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.9, p.2761-2764, 2007.

JANDA, J.M., ABBOTT, S. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.23, n.1, p.35-73, 2010.

JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZABEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, v.142, n.7, p.1881-1893, 1996.

JOHN, N.; HATHA, A.A.M. Distribution, extracellular virulence factors and drug resistance of motile aeromonads in fresh water ornamental fishes and associated carriage water. **International Journal of Aquaculture**, v.3, n.17, p.92-100, 2013.

KHAJANCHI, B.; FADL, A.; BORCHARDT, M.; BERG, R.; HORNEMAN, A.; STEMPER, M.; JOSEPH, S.W.; MOYER, N.P.; SHA, J.; CHOPRA, A.K. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.7, p.2313-2325, 2010.

KHOR, W.C.; PUAH, S.M.; TAN, J.A.M.A.; PUTHUCHEARY, S.D.; CHUA, K.H. Phenotypic and genetic diversity of *Aeromonas* species isolated from fresh water lakes in Malaysia. **PLoS ONE**, v.10, n.12:e0145933, pages13, 2015.

KIM, F.J.P.; SILVA, A.E.M.; SILVA, R.V.S.; KIM, P.C.P.; ACOSTA, A.C.; SILVA, S.M.B.C.; SENA, M.J.; MOTA, R.A. Elevada frequência de *Aeromonas* spp. e genes de virulência em cultivos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em tanques-rede, na região semiárida de Pernambuco, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, n.5, p.1609-1615, 2019.

KINGOMBE, C.I.B.; HUYS, G.; TONOLLA, M.; ALBERT, M.J.; SWINGS, J.; PEDUZZI, R.; JEMMI, T. PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.12, p.5293-5302, 1999.

LAMY, B.; LAURENT, F.; KODJO, A. Validation of a partial rpoB gene sequence as a tool for phylogenetic identification of aeromonads isolated from environmental sources. **Canadian Journal of Microbiology**, v.56, p.217-228, 2010.

LAMY, B.; KODJO, A.; LAURENT, F.; ColBVH Study Group. Identification of *Aeromonas* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.71, p.1-5, 2011.

LAZADO, C.C.; ZILBERG, D. Pathogenic characteristics of *Aeromonas veronii* isolated from the liver of a diseased guppy (*Poecilia reticulata*). **Letters in Applied Microbiology**, v.67, p.476-483, 2018.

LEIRA, M.H.; LAGO, A.A.; BOTELHO, H.A.; MELO, C.C.V.; MENDONÇA, F.G.; NASCIMENTO, A.F.; FREITAS, R.T.F. Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil – uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v.3, n.1, p.044-059, 2016.

LIMA, L.C.; RIBEIRO, L.P.; LEITE, R.C.; MELO, D.C. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.3/4, p.113-117, 2006.

LORÉN, J.G.; FARFÁN, M.; FUSTÉ, M.C. Species delimitation, phylogenetic relationships, and temporal divergence model in the genus *Aeromonas*. **Frontiers in Microbiology**, v.9, 13 pages, 2018.

LUND, V.; JENSSEN, L.M.; WESMAJERVI, M.S. Assessment of genetic variability and relatedness among atypical *Aeromonas salmonicida* from marine fishes, using AFLP-fingerprinting. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.50, p.119-126, 2002.

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S.W. Aeromonadales. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T.; GARRITY, G.M. **Bergey's manual of systematic bacteriology: the proteobacteria**. New York: Springer-Verlag, 2005. 2.ed., v.2, p.556-578.

MARTINO, M.E.; FASOLATO, L.; MONTEMURRO, F.; ROSTEGHIN, M.; MANFRIN, A.; PATARNELLO, T.; NOVELLI, E.; CARDAZZO, B.. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.14, p.4986-5000, 2011.

MCLAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M.M.; THRELFALL, E.J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v.56, n.1, p.21-28, 2000.

MILLERSHIP, A.E.; WANT, S.V. Characterisation of strains of *Aeromonas* spp. by phenotype and whole-cell protein fingerprint. **Journal of Medical Microbiology**, v.39, n.2, p.107-113, 1993.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleostéos em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALLOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N.. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004, p.343-383.

MORANDI, A.; ZHAXYBAYEVA, O.; GOGARTEN, J.P.; GRAF, J. Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. **Journal of Bacteriology**, v.187, n.18, p.6561-6564, 2005.

NACESCU, N.; ISRAIL, A.; CEDRU, C.; VENKATESWARAN, K.; KAWAKAMI, H.; HASHIMOTO, H. Hemolytic properties of some *Aeromonas* strains. **Roumanian Archives of Microbiology and Immunology**, v.51, n.3, p.147-156, 1992.

NAKANO, H.; KAMEYAMA, T.; VENKATESWARAN, K.; KAWAKAMI, H.; HASHIMOTO, H. Distribution and characterization of hemolytic, and enteropathogenic motile *Aeromonas* in aquatic environment. **Microbiology and Immunology**, v.34, n.5, p.447-458, 1990.

NAWAZ, M.; KHAN, S.A.; KHAN, A.A.; SUNG, K.; TRAN, Q.; KERDAHI, K.; STEELE, R. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. **Food Microbiology**, v.27, p.327-331, 2010.

PABLOS, M.; HUYS, G.; CNOCKAERT, M.; RODRÍGUEZ-CALEJA, J.M.; OTERO, A.; SANTOS, J.A.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L. Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea water and foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.147, p.203-210, 2011.

PARKER, J.L.; SHAW, J.G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**. v.62, p.109-118, 2011.

PEIXOTO, L.J.S.; SÁ, M.C.A.; GORDIANO, L.A.; COSTA, M.M. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, p.453-461, 2012.

PÉREZ-SANCHO, M.; CERDÁ, I.; FERNÁNDEZ-BRAVO, A.; DOMÍNGUEZ, L.; FIGUERAS, M.J.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F.; VELA, A.I. Limited performance of MALDI-TOF for identification of fish *Aeromonas* isolates at species level. **Journal of Fish Diseases**, v.41, n.10, p.1485-1493, 2018.

PERSING, D.H.; TENOVER, F.C.; VERSALOVICK, J.; TANG, Y.; UNGER, E.R.; RELMAN, D.A.; WHITE, T.J. **Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice**. Washinton DC: ASM Pres, 2004, p.185-195.

PERSSON, S.; AL-SHUWELI, S.; YAPICI, S.; JENSEN, J.N.; OLSEN, K.E.P. Identification of clinical *Aeromonas* species by *rpoB* and *gyrB* sequencing and development of a multiplex PCR method for detection of *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, and *A. media*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.53, n.2, p.653-656, 2015.

PESSOA, R.B.G.; OLIVEIRA, W.F.; MARQUES, D.S.C.; CORREIA, M.T.S.; CARVALHO, E.V.M.M.; COELHO, L.C.B.B. The genus *Aeromonas*: a general approach. **Microbial pathogenesis**, v.130, p.81-94, 2019.

POPOFF, M. Genus III *Aeromonas*. In: KRIEG, N.R. e HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1984. v.1, p.545-548.

POPOVIĆ, N.T.; KAZAZIĆ, S.P.; STRUNJAK-PEROVIĆ, I.; ČOŽ-RAKOVAC, R. Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF MS. **Environmental Research**, v.152, p.7-16, 2017.

RAVI, A.; DAS, S.; BASHEER, J.; CHANDRAN, A.; BENNY, C.; SOMARAJ, S.; SEBASTIAN, S.K.; MATHEW, J.; KRISHNANKUTTY, R.E. Distribution of antibiotic resistance and virulence factors among the bacteria isolated from diseased *Etroplus suratensis*. **3 Biotech**, v.9, n.4, 138.

ROBERTS, R.J. The aquatic environment. In: ROBERTS, R.J. (Ed.). **Fish Pathology**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2012, 4th. 597p.

ROGES, E.M.; GONÇALVES, V.D.; CARDOSO, M.D.; FESTIVO, M.L.; SICILIANO, S.; BERTO, L.H.; PEREIRA, V.L.A.; RODRIGUES, D.P.; AQUINO, M.H.C. Virulence-associated

genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolates from animal, food, and human sources in Brazil. **BioMed Research International**, v.2020, 1052607, 2020.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A.P.; GAASTRA, W. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Veterinary Microbiology**, v.141, n.1-2, p.1-4, 2010.

SEBASTIÃO, F.A. **Validação de técnicas moleculares para o diagnóstico de bactérias em peixes, visando redução de tempo e custo**. 2015. 136f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, 6 de Fevereiro de 2015.

SHARMA, A.; CHANU, T.I.; NAYAK, S.K.; JAHAGEERDAR, S.; KRISHNA, G. Pathogenesis of *Aeromonas caviae* in *Clarias magur*. **Microbial Pathogenesis**, v.169, 105662, 2022.

SILVA, D.V. **Monitoramento da resistência à antimicrobianos na aquicultura: isolamento e infecção experimental de tilápia do Nilo com *Klebsiella pneumoniae***. 2020. 63f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Unesp, Jaboticabal, Fevereiro de 2020.

SILVER, A.C.; WILLIAMS, D.; FAUCHER, J.; HORNEMAN, A.J.; GRAF, J. Complex evolutionary history of the *Aeromonas veronii* group revealed by host interaction and DNA sequence data. **PLoS ONE**, v.6, n.2: e16751, pages12, 2011.

SINDAN. **Compêndio de Produtos Veterinários**, 2018. Disponível em <http://www.cpv.com.br/cpv/>. Acesso em: 05 de outubro de 2020

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

SMITH, K.F.; SCHMIDT, V.; ROSEN, G.E.; AMARAL-ZETTLER, L. Microbial diversity and potential pathogens in ornamental fish aquarium water. **PLoS ONE**, v.7, n.9: e39971, pages11, 2012.

SOLER, L.; YÁÑEZ, M.A.; CHACON, M.R.; AGUILERA-ARREOLA, M.G.; CATALÁN, V.; FIGUERAS, M.J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, n.5, p.1511-1519, 2004.

SORIANO, A.C; CASTILLO, J.A.; MORAL, C.H.; SALAZAR, M.S.; MARCOS, J.Y.; CARRASCO, G.N. RFLP-PCR analysis of the *aroA* gene as a taxonomic tool for the genus *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**, v.156, n.2, p.199-204, 1997.

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

TALAGRAND-REBOUL, E.; ROGER, F.; KIMPER, J.L.; COLSTON, S.M.; GRAF, J.; LATIF-EUGENÍN, F. FIGUERAS, M.J.; PETIT, F.; MARCHANDIN, H.; JUMAS-BILAK, E.; LAMY, B. Delineation of taxonomic species within complex of species: *Aeromonas media* and related species as a test case. **Frontiers Microbiology**, v.8:621, pages14, 2017.

TAVARES, A.B.; CERESER, N.D.; TIMM, C.D. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em alimentos de origem animal e sua importância em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, p.1-8, 2015.

TOMÁS, J.M. The main *Aeromonas* pathogenic factors. **International Scholarly Research Network**, v.2012,pages22, 2012.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P.T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S. COOKSON, B.; FRY, N.K.; FUSSING, V.; GREEN, J. FEIL, E.; GERNER-SMIDT, P.; BRISSE, S.; STRUELENS, M.; Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.13, n.3, p.1-46, 2007.

VÁVROVÁ, A.; BALÁŽOVÁ, T.; SEDLÁČEK, I.; TVRZOVÁ, L.; ŠEDO, O. Evaluation of the MALDI-TOF MS profiling for identification of newly described *Aeromonas* spp. **Folia Microbiologica**, v.60, n.5, p.375-383, 2015.

WANG, G.; CLARK, C.G.; LIU, C.; PUCKNELL, C.; MUNRO, C.K.; KRUK, T.M.A.C.; CALDEIRA, R.; WOODWARD, D.L.; RODGERS, F.G. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.3, p.1048-1054, 2003.

WANG, G.; TYLER, K.D.; MUNRO, C.K.; JOHNSON, W.M. Characterization of cytotoxic, hemolytic *Aeromonas caviae* clinical isolates and their identification by determining Presence of a unique hemolysin gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.12, p.3203-3205, 1996.

ZDANOWICZ, M.; MUDRYK, Z.J.; PERLIŃSKI, P. Abundance and antibiotic resistance of *Aeromonas* isolated from water of three carp ponds. **Veterinary Research Communications**, v.44, p9-18, 2020.

ZHAO, X.L.; CHEN, H.; ZHONG, K.K.; LI, L.; KONG, X.H.; Myo-inositol as an adjuvant to florfenicol against *Aeromonas hydrophila* infection in common carp *Cyprinus carpio*. **FEMS Microbiology Letters**, v.365, n.20, fny212 , 2018.

ZHU, F.; YANG, Z.; ZHANG, Y.; HU, K.; FANG, W. Transcriptome differences between enrofloxacin-resistant and enrofloxacin-susceptible strains of *Aeromonas hydrophila*. **PLoS ONE**, v.12, n.7, e0179549, 2017.