

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL**



**DISSERTAÇÃO**

**ANTIBIORRESISTÊNCIA E PESQUISA DE FATORES DE  
VIRULÊNCIA EM *AEROMONAS* SPP.**

**Cynthia Armelle Bezerra Alves Barroco**

**MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA**

**2013**

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL**



**ANTIBIORRESISTÊNCIA E PESQUISA DE FATORES DE  
VIRULÊNCIA EM *AEROMONAS* SPP.**

Dissertação orientada pela Doutora Teresa Semedo Lemsaddek (CIISA-FMV)  
e pela Prof<sup>a</sup>. Doutora Ana Maria Reis (FCUL)

**Cinthia Armelle Bezerra Alves Barroco**

**MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA**  
**2013**



ANTIBIORRESISTÊNCIA E PESQUISA DE FATORES DE  
VIRULÊNCIA EM *AEROMONAS* SPP.

**Cinthia Armelle Bezerra Alves Barroco**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
2013**

Esta dissertação foi realizada no Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal – Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa (CIISA-FMV) sob a orientação direta da Doutora Teresa Semedo Lemsaddek no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. A Professora Doutora Ana Maria Gonçalves Reis foi a orientadora interna designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

## Agradecimentos:

Agradeço primeiramente à minha orientadora científica, a Doutora Teresa Semedo Lemsaddek, por todo o apoio e transmissão de conhecimentos durante todo o meu percurso, pela colaboração incansável, paciência, dedicação e pelas críticas construtivas, agradeço principalmente a motivação e a força que tantas vezes foram necessárias. Professora Teresa, muito obrigada pela tua preciosa e constante presença.

À Professora Doutora Ana Maria Gonçalves Reis, por ter aceite co-orientação deste trabalho, pelo apoio, preocupação, disponibilidade, estímulos positivos e palavras sempre confortantes.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa e a todos os meus colegas do Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar, Secção de Tecnologia dos Produtos Animais. À Professora Doutora Maria João Fraqueza, ao Professor Doutor António Salvador Barreto, à Engenheira Maria José Fernandes, à Maria Helena Fernandes, à Ana Rita Henriques, à Ana Martins, à Marta Nascimento, agradeço o enorme carinho com que me receberam todos os dias, proporcionado o ótimo ambiente que contribuíram imenso para a realização deste trabalho.

Às minhas colegas de laboratório, Verónica Santos, Mafalda Alho e Sara Craveiro por estarem sempre disponíveis, pela amizade e sentido de humor que tornaram esta caminhada ainda mais agradável.

Às Professoras Doutoradas Lélia Chambel, Manuela Carolino e Margarida Barata, agradeço os incentivos, preocupação e todo carinho demonstrado nas palavras amigas. Aproveito esta oportunidade para também agradecer todo o contributo para a minha formação, não só durante o mestrado mas também durante a minha licenciatura e por me terem transmitido a “paixão” pela microbiologia.

Às Doutoradas Teresa Crespo e Cristina Belo Correia, agradeço a colaboração e por terem proporcionado o enriquecimento da nossa coleção de isolados.

Agradeço à colaboração do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, do Hospital de Cascais Dr. José de Almeida, e da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz.

À todos os meus amigos, aos meus pais e irmãos, muito obrigada por todo incentivo e compreensão e peço milhões de desculpas pela minha ausência durante este último ano.

Agradeço principalmente aos dois homens da minha vida, o meu Marido Rui e o meu pequeno “gigante” Arthurzinho. Apesar de repetirem tantas vezes “gostas mais desta tese que de nós”, o vosso companheirismo permitiu que eu alcançasse esta vitória. Vocês me fizeram enxergar as melhores coisas desta vida e me fazem sentir vontade de voar mais alto. Amo-vos muito.

# Índice

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Características gerais do género <i>Aeromonas</i> .....	1
1.1.1	Identificação e classificação.....	1
1.1.2	Ecologia.....	4
1.2	Potencial de Patogenicidade.....	5
1.2.1	Etiologia.....	5
1.2.2	Fatores de virulência.....	6
1.2.3	Perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos .....	11
1.3	Objetivos.....	16
2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
2.1	Recolha e processamento das amostras .....	16
2.2	Identificação ao nível de género .....	18
2.3	Tipificação genómica .....	18
2.4	Avaliação do potencial de patogenicidade .....	19
2.4.1	Testes em placa .....	19
2.4.2	Pesquisa dos genes de virulência.....	20
2.4.3	Perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos .....	21
2.4.4	Análise estatística.....	21
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
3.1	Isolamento e identificação ao nível de género .....	22
3.2	Tipificação genómica .....	25
3.3	Potencial de patogenicidade .....	27
3.3.1	Fatores de virulência.....	27
3.3.2	Perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos .....	31
3.3.3	Potencial de patogenicidade dos isolados em estudo.....	34
4	CONCLUSÕES.....	39
5	REFERÊNCIAS .....	41
	Anexo A - Descrição das amostras e os respetivos locais de amostragem. ....	46
	Anexo B - Lista dos <i>primers</i> e condições de reação de PCR. ....	48
	Anexo C - Isolados analisados na pesquisa de fatores de virulência e na análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.....	49
	Anexo D - Dendrograma obtido a partir dos perfis de RAPD-PCR, perfis de virulência e de resistência dos isolados representantes da coleção em estudo (N = 111). ....	50

## **Índice das tabelas**

Tabela 1. Principais mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos. ....	12
Tabela 2. Estudos dos perfis de suscetibilidade de isolados clínicos e ambientais de <i>Aeromonas</i> aos diferentes antimicrobianos comumente avaliados. ....	15
Tabela 3. Tipo de amostra e respectivos volumes de água peptonada tamponada utilizados na homogeneização.....	17
Tabela 4. Condições de reação de PCR utilizados na identificação molecular do género. ....	18
Tabela 5. Condições de reação de PCR utilizados na tipificação genómica.....	19
Tabela 6. Reações de Multiplex-PCR – Concentrações dos reagentes utilizados na pesquisa dos genes de virulência. ....	20
Tabela 7. Concentrações e os respectivos <i>breakpoints</i> (mm) para os 16 agentes antimicrobianos utilizados neste estudo.....	21
Tabela 8. Prevalência de <i>Aeromonas</i> spp. nos diferentes locais de amostragem. ....	24
Tabela 9. Número total de isolados positivos para a presença de potenciais fatores de virulência.....	28
Tabela 10. Número total de isolados de <i>Aeromonas</i> spp. com resistência aos antimicrobianos analisados neste estudo.....	31
Tabela 11. Fenótipo de multirresistência observados entre os isolados em estudo.....	33

## **Índice das figuras**

Figura 1. Nº total de isolados recuperados nos diferentes locais de amostragem. ....	22
Figura 2. A e B – Colónias características de <i>Aeromonas hydrophila</i> em meio seletivo <i>Aeromonas medium base</i> . ....	23
Figura 3. Dendrograma obtido a partir dos perfis de RAPD-PCR para os isolados do hipermercado. ....	27

## **Resumo**

Os membros do gênero *Aeromonas* são reconhecidos como patógenos emergentes responsáveis por uma vasta panóplia de doenças infecciosas em humanos. Entre as infecções associadas a este gênero, a gastroenterite é a manifestação clínica mais comum.

No presente estudo, pesquisou-se a ocorrência de aeromonas numa fábrica de queijos, num matadouro de suínos e num hipermercado. Foram estudadas 85 amostras, que incluíram amostras de água, de alimentos e de superfícies. A análise dessas amostras permitiu a recuperação de 72 *Aeromonas* spp., cujo potencial de patogenicidade foi avaliado através da pesquisa de fatores de virulência e perfis de suscetibilidade a 16 agentes antimicrobianos.

A análise do potencial patogénico revelou a elevada produção de proteínas extracelulares ativas: DNases (86%), lipases (61%), proteases (93%), e hemolisinas (99%). Relativamente aos genes de virulência, as percentagens mais elevadas foram observadas para *act* (55%), *ahyB* (54%), *alt* (53%) e *lip* (53%), frequências inferiores a 40% foram observadas para *flaA/B*, *hlyA*, *ascV*, *aext*, e *ast*. Na globalidade, os resultados revelam múltiplas combinações de potenciais fatores de virulência entre os isolados em estudo. Quanto à resistência a antibióticos, os níveis mais elevados foram observados para amoxicilina/ácido clavulânico (36%), ácido nalidíxico (29%) e tetraciclina (17%). Níveis mais reduzidos de resistência (<10%) foram detetados para a amicacina, aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, norfloxacina e trimetoprim/ sulfametoxazol. Todos os isolados apresentaram sensibilidade ao imipenem e levofloxacina.

Em conclusão, os resultados obtidos revelaram a ampla disseminação de aeromonas potencialmente patogénicas nos diferentes ambientes em estudo, tendo-se detetado fenótipos de resistência a antibióticos clinicamente importantes e diferentes combinações de potenciais fatores de virulência relacionados com a adesão, invasão e disseminação no hospedeiro. No entanto, as estirpes com maior potencial de patogenicidade foram maioritariamente detetadas em ambientes cujos alimentos serão sujeitos a tratamento térmico antes do consumo, reduzindo o risco associado a presença de aeromonas.

**Palavras-chave:** *Aeromonas* spp., fatores de virulência, suscetibilidade a antimicrobianos, multirresistência.

## **Abstract**

Members of the genus *Aeromonas* are recognized as emerging pathogens responsible for a variety of infectious diseases in humans, gastroenteritis being the most common clinical manifestation.

In the present study, the presence of *Aeromonas* spp. was evaluated in samples collected from a cheese factory, a slaughterhouse and a supermarket. Eighty-five samples from drinking-water, food and food-processing surfaces were studied. The analysis of those samples allowed the isolation of 72 aeromonads and corresponding pathogenicity potential investigated by screening for putative virulence factors and assessment of the susceptibility profiles to 16 antimicrobial agents.

A high extracellular production of proteins active, DNases (86%), lipases (61%), proteases (93%) and hemolysins (99%) was observed among the isolates under study. Regarding the presence of virulence genes, the highest frequencies were observed for *act* (55%), *ahyB* (54%), *alt* (53%) and *lip* (53%) while prevalencies lower than 40% were observed for *flaA/B*, *hlyA*, *ascV*, *aext* and *ast*. Overall, the results revealed multiple combinations of putative virulence factors among the isolates under analysis. Regarding the antimicrobial resistance profiles, higher levels of resistance were detected for amoxicillin/clavulanic acid (36%), nalidixic acid (29%) and tetracycline (17%). Lower resistances (<10%) was observed for amikacin, aztreonam, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, norfloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole. All isolates were susceptible to imipenem and levofloxacin.

In conclusion, our results demonstrated a high dissemination of putatively pathogenic aeromonads in the different environments investigated, detected phenotypes of resistance to medically important antibiotics and distinct combinations of genetic determinants for enterotoxins, hemolysins and factors associated with adherence, tissue invasion and spread in the host were identified. However, strains with greater pathogenic potential were identified in environments whose food will undergo heat treatment before consumption, reducing the risk associated with the presence of aeromonads.

**keywords:** *Aeromonas* spp., , virulence traits, antimicrobial susceptibility, multidrug resistance.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Características gerais do género *Aeromonas*

Ubiquitários de ambientes aquáticos, os membros do género *Aeromonas* estão amplamente disseminados na natureza. Este género constitui um grupo fenotípico e genotipicamente heterogéneo (Martin-Carnahan and Joseph, 2005), são fisiologicamente versáteis, exibem plasticidade metabólica e considerável potencial de virulência, o que permite a disseminação e manutenção destes microrganismos em diferentes nichos ecológicos (Seshadri, 2006).

De uma forma geral, este género inclui bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, que normalmente expressam as enzimas citocromo-c-oxidase e catalase. São quimiorganotróficas, exibindo metabolismo oxidativo e fermentativo da D-glicose. São anaeróbias facultativas, e capazes de realizar a redução dissimilatória de metais. As condições ótimas de crescimento compreendem o intervalo de temperatura entre 22 e 37°C, no entanto, a temperatura de crescimento pode variar de 0 a 45°C. Os valores ótimos de pH variam entre 5,5 e 9,0. São halotolerantes em concentrações até 4% de cloreto de sódio (Martin-Carnahan and Joseph, 2005).

Relativamente à morfologia celular, são bacilos retos mas podem ocorrer formas cocobacilares, com extremidades arredondadas, e as dimensões variam entre 0,3-1,0 µm x 1,0-3,5 µm. Ocorrem isoladamente, em pares, ou raramente em cadeias curtas. Com exceção da espécie *A. salmonicida* e algumas estirpes de *A. media* e *A. caviae*, as espécies deste género são móveis exibindo um único flagelo polar (monótricos). Algumas espécies exibem flagelos laterais expressos diferencialmente em meio sólido. Este grupo bacteriano, enzimaticamente muito ativos, tem sido relatado como produtor de amilases, DNases, quitinases, elastases, esterases, peptidases, arilamidases e outras enzimas hidrolíticas (Martin-Carnahan and Joseph, 2005).

### 1.1.1 Identificação e classificação

Após diversas tentativas de classificação deste género cujos primeiros isolados remontam ao final do século XIX (Farmer III *et al.*, 2006), só em 1936, o género "*Aeromonas*" (do grego "*aer*" - ar ou gás e "*monas*" - unidade) foi proposto por Kluyven e Van Niel, tendo por base três espécies mesófilas móveis, *A. hydrophila*; *A. punctata*; e *A. liquefaciens* e uma espécie psicrófila não móvel, *A. salmonicida* (Schubert, 1967). Inicialmente o género *Aeromonas* foi incluído na família Pseudomonadaceae mas na oitava edição do *Bergey's Manual - Determinative Bacteriology* (1974) é publicada a alteração do género *Aeromonas* para a família Vibrionaceae.

O estudo filogenético baseado na análise das sequências do rRNA 16S realizado em 1992 por Martínez-Murcia e colaboradores indicou que o género *Aeromonas* não está intimamente relacionado com os vibrios e agrupa-o numa unidade monofilética na subclasse  $\gamma$ -*Proteobactérias*. Estas conclusões permitiram a integração de uma nova família, Aeromonadaceae, e a inserção do género *Aeromonas*. Assim, atualmente, o género *Aeromonas* pertence à família Aeromonadaceae, ordem *Aeromonadales*, classe *Proteobacteria* e subclasse  $\gamma$ -*Proteobacteria* (Martin-Carnahan and Joseph, 2005).

Ao longo das últimas décadas a identificação molecular deste género foi regida pelo uso das sequências do rRNA 16S, abordagem que passou a ser amplamente aplicada, e várias espécies foram

descritas a partir de apenas um isolado, com base unicamente na informação filogenética inferida a partir deste marcador (Naharro *et al.*, 2011).

Atualmente são reconhecidas vinte e oito espécies válidas (incluindo 12 subespécies) no género *Aeromonas*. De acordo com Euzéby J.P. [<http://www.bacterio.cict.fr/a/aeromonas.html>. Acesso em Novembro de 2012], o género inclui as seguintes espécies: *Aeromonas allosaccharophila* (Martinez-Murcia *et al.*, 1992); *Aeromonas aquariorum* (Martínez Murcia *et al.*, 2008); *Aeromonas bestiarum* (Ali *et al.*, 1996); *Aeromonas bivalvium* (Miñana Galbis *et al.*, 2007); *Aeromonas caviae* (Popoff, 1984); *Aeromonas culicicola* (Pidiyar *et al.*, 2002); *Aeromonas diversa* (Miñana-Galbis *et al.*, 2010); *Aeromonas encheleia* (Esteve *et al.*, 1995); *Aeromonas enteropelogenes* (Schubert *et al.*, 1991); *Aeromonas eucrenophila* (Schubert and Hegazi, 1988); *Aeromonas fluvialis* (Alperi *et al.*, 2010); *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901); *Aeromonas ichthiosmia* (Schubert *et al.*, 1991); *Aeromonas jandaei* (Carnahan *et al.*, 1992); *Aeromonas media* (Allen *et al.*, 1983); *Aeromonas molluscorum* (Miñana-Galbis *et al.*, 2004); *Aeromonas piscicola* (Beaz Hidalgo *et al.*, 2010); *Aeromonas popoffii* (Huys *et al.*, 1997); *Aeromonas rivuli* (Figueras *et al.*, 2011); *Aeromonas salmonicida* (Lehmann and Neumann 1896); *Aeromonas sanarellii* (Alperi *et al.*, 2010); *Aeromonas schubertii* (Hickman-Brenner *et al.*, 1989); *Aeromonas sharmana* (Saha and Chakrabarti, 2006); *Aeromonas simiae* (Harf-Monteil *et al.*, 2004); *Aeromonas sobria* (Popoff and Véron, 1981); *Aeromonas taiwanensis* (Alperi *et al.*, 2010); *Aeromonas tecta* (Demarta *et al.*, 2010) e *Aeromonas veronii* (Hickman-Brenner *et al.*, 1988).

Recentemente foram propostas duas espécies novas, *Aeromonas australiensis* isolada de água de irrigação na Austrália (Aravena-Román *et al.*, 2012) e *Aeromonas cavernícola* isolada de um riacho numa caverna na República Checa (Martínez-Murcia *et al.*, 2012).

Em muitos casos, a validade das espécies de *Aeromonas* não é universalmente aceite (Martino *et al.*, 2011). Esta observação deve-se ao facto de que as análises baseadas nas sequências do rRNA 16S, muitas vezes não serem claras ao nível de espécie (Martin-Carnahan and Joseph, 2005). Como consequência, nos últimos anos, a reclassificação de espécies já descritas promoveu consideráveis revisões taxonómicas e nomenclaturais neste género.

De facto, nas espécies do género *Aeromonas* foram encontradas diversas inconsistências entre relações filogenéticas obtidas a partir sequenciação do rRNA 16S e análises de hibridação DNA-DNA (Demarta *et al.*, 2000; Martínez-Murcia *et al.*, 2005; Martin-Carnahan and Joseph, 2005).

As razões para estas discrepâncias giram em torno da evolução de “moléculas quiméricas” nas sequências dos operões ribossomais, que põe em evidência acontecimentos de transferência horizontal. Estes eventos são possíveis pois os genes ribossomais estão organizados em operões e algumas das espécies do género *Aeromonas* possuem até 10 operões ribossomais cujas cópias podem diferir em até 1,5%. (Seshadri, 2006). Esta heterogeneidade Intragenómica foi detetada na maioria das espécies de *Aeromonas* (Morandi *et al.*, 2005). Adicionalmente, o elevado grau de conservação das sequências de rRNA 16S entre algumas espécies não permite a separação das mesmas (Naharro *et al.*, 2011), sugerindo que este marcador nem sempre reflete as relações filogenéticas neste género e deve ser usado com precaução na identificação de espécies (Janda and Abbott, 2007; Morandi *et al.*, 2005; Seshadri, 2006). Estas incongruências podem ser explicadas em termos de transferência horizontal de genes e recombinação. Portanto, no género *Aeromonas* a sequência rRNA 16S gene só é útil para definir os isolados ao nível de género, sendo necessário outros genes *housekeeping* para a identificação correta das espécies de *Aeromonas* (Naharro *et al.*, 2011).

Pelas razões anteriormente referidas, ao longo dos últimos anos, um elevado número de marcadores moleculares têm sido utilizados para avaliar as relações filogenéticas entre as espécies de *Aeromonas*. Além

do rRNA 16S, têm vindo a ser analisadas as sequências dos genes *gyrB* (subunidade beta da DNA girase), *rpoD* (fator sigma 70), *rpoB* (subunidade  $\beta$  da DNA polimerase dependente de RNA), e *dnaJ* (proteína de choque térmico), cuja dimensão do fragmento de amplificação varia entre 934 e 1,100 pb (Kupfer *et al.*, 2006; Nhung *et al.*, 2007; Saavedra *et al.*, 2006; Soler *et al.*, 2004; Yanez *et al.*, 2003 in Janda and Abbott, 2010). Os percentuais de semelhanças entre as sequências nucleotídicas nos genes *housekeeping rpoD* e *dnaJ* variam entre 89% e 92% ao contrário dos 98,7% observados nas sequências do rRNA 16S (Nhung *et al.*, 2007 in Janda and Abbott, 2010). Consequentemente, o poder discriminatório resultante da análise dos genes *rpoD* e *dnaJ* em relação à filogenia do género *Aeromonas* é consideravelmente superior, sendo assim considerados como excelentes cronómetros moleculares para inferências filogenéticas neste género.

No entanto, foram também observados resultados incongruentes que apoiam a hipótese da ocorrência de transferência horizontal entre genes *housekeeping* e posteriores eventos de recombinação (Martin-Carnahan and Joseph, 2005), o que sugere que uma abordagem de identificação baseada num único gene pode não ser apropriada para a caracterização fidedigna deste género bacteriano (Martino *et al.*, 2011).

Assim sendo, uma abordagem multigénica baseada na análise das sequências de múltiplos loci génicos (MLST - *Multi-Locus Sequence typing*), tem sido indicada como método promissor para o estudo das relações filogenéticas, e para a reavaliação do conceito de espécie em bacteriologia (Stackebrandt *et al.*, 2002). Esta análise utilizando vários genes *housekeeping* reduz os efeitos de enviesamento causados pelas possíveis recombinações ocorridas em *locus* individuais, desta forma proporciona uma filogenia mais robusta. Alguns estudos recentes dão suporte a aplicação da técnica para a caracterização, identificação e tipificação de *Aeromonas* spp. (Frédéric *et al.*, 2012; Martino *et al.*, 2011; Martinez-Murcia *et al.*, 2011).

Apesar das limitações envolvendo a análise das sequências do rRNA 16S no que diz respeito à identificação de espécies de *Aeromonas*, a grande maioria das técnicas moleculares para identificação ao nível de espécie, tem sido focada nas sequências neste gene. Os métodos utilizados para identificar isolados de *Aeromonas* variam consideravelmente de um estudo para outro, técnicas como Ribotipagem (Demarta *et al.*, 2000), RFLP - *restriction length fragment polymorphisms* (Soler *et al.*, 2002; Figueras *et al.*, 2000), ARDRA - *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*, AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism* (Pablos *et al.*, 2011); Estes métodos têm sido úteis e adequadas em laboratórios de investigação bem equipados, onde vários métodos (dentro de uma abordagem polifásica) são utilizados para a classificação exata, o que excede a capacidade da maioria dos laboratórios clínicos onde são realizadas análises de rotinas (Chacón *et al.*, 2002; Janda and Abbott, 2010).

Ao longo dos últimos anos, uma elevada variedade de métodos moleculares de tipificação foram utilizados para a determinação da estrutura clonal entre as espécies de *Aeromonas* para fins epidemiológicos, ecológicos ou taxonómicos. Entre as várias técnicas, as comumente utilizadas incluem: PFGE - *pulsed-field gel electrophoresis* (método *gold-standard*); RAPD-PCR - *Random Amplification of Polymorphic DNA*; REP-PCR - *Repetitive Extragenic Palindromic* e ERIC-PCR *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*. Muitas vezes os métodos são usados em combinação, a fim de se alcançar uma melhor discriminação (Khajanchi *et al.*, 2010; Pablos *et al.*, 2011; Sinha *et al.*, 2004; Szczuka and Kaznowski, 2004; Tacão *et al.*, 2005). Grande parte dos autores apoiam que a utilização destas técnicas possuem em elevado poder discriminatório de diferenciação, no entanto a grande maioria dos estudos não demonstram relação genética estreita intra-espécies entre isolados de diferentes fontes.

### 1.1.2 Ecologia

As bactérias do género *Aeromonas* fazem parte do microbiota autóctone de ecossistemas aquáticos (Figueira *et al.*, 2011; Martin-Carnahan and Joseph, 2005; Palu *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007), desta forma, os membros deste género estão distribuídos universalmente. Podem ser isolados a partir de uma vasta panóplia de fontes ambientais, incluindo águas estuarinas, termais, residuais, de nascentes minerais naturais, água potável, solos, sedimentos e vegetais (Biscardi *et al.*, 2002; Daskalov, 2006; Huddleston *et al.*, 2006; Parker and Shaw, 2011; Scoaris *et al.*, 2008; Soler *et al.*, 2002). Apesar de não serem considerados de origem fecal, existe evidências que apontam para a sua capacidade de tolerar ambientes poluídos (Martin-Carnahan and Joseph, 2005). Embora não estando estudado em detalhe, isolados de *Aeromonas* são frequentemente recuperados a partir do trato gastrointestinal e tecidos infetados de animais, incluindo peixes, répteis, anfíbios, aves, suínos, ovelhas, bovinos e animais domésticos (EPA-EUA 2006), estes dados sugerem que os animais atuam como reservatório ambiental de *Aeromonas*.

Existe uma tendência sazonal na incidência de *Aeromonas*, com maior frequência de isolamento de fontes ambientais durante os meses de verão (Sinha *et al.*, 2004). A mesma sazonalidade é observada em relação à frequência de isolados clínicos recuperados a partir do trato gastrointestinal de humanos (Edberg *et al.*, 2007; Parker and Shaw, 2011; Tsai *et al.*, 2006). Este aumento em números deve-se a uma maior proliferação de *Aeromonas* mesófilas à temperaturas mais elevadas, levando ao aumento da concentração destas bactérias em ecossistemas aquáticos (Edberg *et al.*, 2007), isto traduz-se em maior exposição e, portanto, um potencial perigo acrescido de desenvolvimento de colonização e/ou infeção por estes microrganismos (Janda and Abbott, 2010).

Embora a maioria das estratégias de tratamento de água proporcione uma redução significativa do número de *Aeromonas*, vários estudos mostram evidências de que estas bactérias exibem mecanismos adaptativos que permitem a sua sobrevivência e proliferação nos sistemas de distribuição de água (Figueira *et al.*, 2011). Uma estratégia preocupante e que tem sido tema de inúmeros estudos é a capacidade destas bactérias formarem biofilmes (Bomo *et al.*, 2004; Chauret *et al.*, 2001; Scoaris *et al.*, 2008). A natureza da estrutura do biofilme e os atributos fisiológicos conferem às bactérias uma resistência inerente aos agentes antimicrobianos incluindo antibióticos, radiação UV e desinfetantes (Donlan and Costerton, 2002; Mohamed and Robert, 1999), favorecendo a sua manutenção e disseminação nos vários nichos ecológicos.

Devido à ampla disseminação em diversos ecossistemas aquáticos, os membros deste género microbiano encontram múltiplas oportunidades para a transmissão aos seres humanos. A grande maioria dos dados disponíveis dão suporte à hipótese de que infeções por este género bacteriano são devidas principalmente à ingestão de água e/ou alimentos contaminados (Janda and Abbott, 2010; Scoaris *et al.*, 2008; Sen and Rodgers, 2004). Vários estudos relatam elevadas frequências de isolamento de *Aeromonas* numa variedade de alimentos de origem animal e vegetal que são utilizados na alimentação humana (Daskalov, 2006; Kingombe *et al.*, 2010; Neyts *et al.*, 2000; Palu *et al.*, 2006).

Infeções extraintestinais com origens ambientais podem surgir a partir do contacto com a água após trauma, infeções invasivas como septicemia podem estar relacionadas a atividades em ambientes aquáticos (Igbinosa *et al.*, 2012; Janda and Abbott, 2010). A omnipresença ambiental associada ao potencial patogênico dessas bactérias foi ilustrada também em recentes desastres naturais como o tsunami que atingiu a Tailândia em Dezembro de 2004. Neste estudo, 305 sobreviventes desenvolveram infeção de pele e dos tecidos subjacentes, e o género *Aeromonas* foi classificado como o patógeno maioritário, representando mais de 20% dos 641 isolados identificados (Dixon *et al.*, 2008 in Janda and Abbott, 2010).

Provavelmente uma das vias de transmissão subestimada, que leva à infecções de feridas associada a *Aeromonas*, é através de picadas de várias espécies animais, principalmente répteis (Angel *et al.*, 2002). O microbiota da orofaringe de répteis, cobras em particular, muitas vezes abriga espécies de *Aeromonas* (Janda and Abbott, 2010). Relatos de casos recentes têm documentado infecções associadas a este gênero resultantes de picadas de vertebrados menos comumente encontrados, tais como ursos (Kunimoto *et al.*, 2004 in Janda and Abbott, 2010).

No entanto, a real prevalência das diferentes espécies do gênero *Aeromonas* em amostras clínicas é desconhecida. Uma das razões assinaladas para esta ausência de dados reside no fato de alguns sistemas bioquímicos comerciais, ainda largamente utilizados em diagnóstico microbiológico de rotina, não diferenciarem de forma eficiente as espécies deste gênero (Lamy *et al.*, 2010; Pablos *et al.*, 2011; Soler *et al.*, 2003). A identificação de *Aeromonas* spp. baseada em características bioquímicas é confusa, produz resultados ambíguos e muitas vezes incorretos, uma vez que nem sempre os resultados são congruentes com a identificação molecular (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Martin-Carnahan and Joseph, 2005). A maior dificuldade na identificação de *Aeromonas* ao nível de espécie deve-se à falta de um conjunto de marcadores fenotípicos que permitam a distinção de cada um dos grupos (Naharro *et al.*, 2011). Apesar dos problemas atrás referidos as características bioquímicas podem ser extremamente úteis numa triagem inicial e identificação ao nível de gênero, no entanto, é comum alguns isolados do gênero *Aeromonas* serem erradamente identificados como membros de outro gênero, principalmente *Vibrio* spp. (Chacón *et al.*, 2002; Chopra and Houston, 1999; Emekdas *et al.*, 2006).

## 1.2 Potencial de Patogenicidade

### 1.2.1 Etiologia

O papel dos membros do gênero *Aeromonas* como agentes etiológicos causadores de doenças sistêmicas em animais poiquilotérmicos é conhecido há mais de um século, assumindo uma importância pelas consideráveis perdas ambientais e económicas (Naharro *et al.*, 2011). Somente durante as últimas três décadas o seu papel numa variedade de doenças humanas foi relevantemente documentado. Embora cerca de 85% dos isolados clínicos pertençam as espécies *A. hydrophila*, *A. veronii* *bv sobria* e *A. caviae*, em menor frequência são relatados isolados clínicos pertencentes a outras espécies deste gênero (Farmer III *et al.*, 2006). O crescente número de casos e gravidade das infecções intestinais e extraintestinais documentados em todo mundo levou à inclusão do gênero *Aeromonas* na lista dos patogénicos emergentes (Ecker *et al.*, 2005).

O espectro de infecções causadas por *Aeromonas* em seres humanos tem expandido e atualmente inclui septicemia, celulite, gastroenterite, peritonite, endocardite, meningite, infecções do trato urinário, doenças hepatobiliares, infecções oculares e pneumonia (Khajanchi *et al.*, 2010; Sen and Rodgers, 2004; Wu *et al.*, 2007). Complicações raras, porém graves e alarmantes são as associações de *Aeromonas* spp. com a síndrome hemolítico-urémica (Bogdanovic *et al.*, 1991 in Seshadri, 2006) e fasciite necrozante (Angel *et al.*, 2002; Fosse *et al.*, 2004).

A gastroenterite é a manifestação clínica mais comum associada ao gênero *Aeromonas* (Abbott *et al.*, 2003). Embora o seu papel como agentes etiológicos de gastroenterite bacteriana ainda não esteja claramente compreendido (Sinha *et al.*, 2004), a forte associação entre a gastroenterite e *Aeromonas* tem sido demonstrado em crianças e idosos (Sinha *et al.*, 2004; Vila *et al.*, 2003). Adicionalmente, o gênero

*Aeromonas* tem sido associado a casos de diarreia (2%) em viajantes para a África, América Latina e Ásia (Vila *et al.*, 2003).

Elementos que apoiam a correlação de *Aeromonas* como patógenos intestinais decorre de relatos de casos detalhados, estudos epidemiológicos de caso-controle (Janda and Abbott, 1998), de evidências de resposta imunitárias do hospedeiro e/ou evidência patológica de infecção. Um dos maiores impedimentos para estabelecer o papel de *Aeromonas* como um verdadeiro patógeno gastrointestinal tem sido a incapacidade de identificar um surto único de diarreia com uma relação clonal causada por este agente (Janda and Abbott, 2010). Acredita-se que a dificuldade em atribuir um papel inequívoco para a causa da diarreia, é por este género constituir um grupo heterogéneo e incluir alguns subgrupos não patogénicos (Graevenitz, 2007; Vila *et al.*, 2003). Assim, a incidência de gastroenterites associadas a *Aeromonas* spp. pode estar a ser fortemente subestimada (Janda and Abbott, 2010), principalmente porque grande parte dos laboratórios não preconiza a pesquisa de aeromonas em cultura de fezes.

A doença invasiva por excelência associada ao género *Aeromonas* é a septicemia (Janda and Abbott, 2010), está associada principalmente a pacientes imunocomprometidos e tem uma taxa de letalidade de mais de 90% (Janda *et al.*, 1996 in Parker and Shaw, 2011). Em raras ocasiões, pode ocorrer em adultos aparentemente saudáveis, geralmente decorrente de graves infeções de feridas causadas por este agente. Os contextos clínicos associados à infeções de feridas por *Aeromonas* incluem lacerações/escoriações em ambientes aquáticos, lesões penetrantes e procedimentos clínicos invasivos (Janda and Abbott, 1998). Infeções intestinais (gastroenterite, colite, peritonite e colangite) podem evoluir para infeções extraintestinais e em raras ocasiões pode levar à meningite em indivíduos imunocomprometidos (Parker and Shaw, 2011).

### 1.2.2 Fatores de virulência

Em *Aeromonas*, os mecanismos de virulência não estão completamente eluciados, apesar de décadas de intensa investigação (Naharro *et al.*, 2011). Tem sido descrita uma elevada variedade de produtos extracelulares biologicamente ativos associados ao potencial patogénico do género. Apesar de não estar estabelecido um modelo animal que reproduza fielmente a síndrome associada, ensaios com mutantes isogénicos em células animais demonstram que diversos fatores de virulência produzidos por aeromonas estão associados a sua patogénese (Janda and Abbott, 2010). Tais fatores estão envolvidos nos processos de adesão e invasão das células do hospedeiro (ex. flagelos, pili e adesinas); evasão aos mecanismos de defesa inata e adquiridas do hospedeiro (ex. cápsulas, *S-layer*, leucocidinas e lipopolissacarídeos) e fatores como enterotoxinas, proteases, fosfolipases, e hemolisinas estão associadas à obtenção de nutrientes que permitem a multiplicação e disseminação do microrganismo no hospedeiro (Khajanchi *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2005).

Várias enzimas secretadas por aeromonas são conhecidas por desempenhar um papel importante nos processos de invasão e estabelecimento de infeções, estando associadas à aquisição de compostos de carbono e azoto por degradação dos componentes da célula hospedeira (Cascón *et al.*, 2000<sup>a</sup>). Entre as enzimas extracelulares produzidas estão descritas várias classes que contribuem para a versatilidade metabólica e facilitam as interações ecológicas com outro organismo, estão incluída, amilases (Chang *et al.*, 1993 in Scoaris *et al.*, 2008), quitinases (Chen *et al.*, 1991 in Scoaris *et al.*, 2008), lipases (Anguita *et al.*, 1993 in Scoaris *et al.*, 2008), proteases (Rivero *et al.*, 1990 in Scoaris *et al.*, 2008) e DNases extracelulares (Chang *et al.*, 1992 in Scoaris *et al.*, 2008).

## DNases

Embora ainda não esteja comprovada experimentalmente a correlação entre a presença de diferentes nucleases extracelulares em *Aeromonas* e a patogenicidade associada ao gênero, alguns autores apoiam a hipótese de que estas enzimas participam no desenvolvimento de um processo infeccioso (Pemberton *et al.*, 1997; Scoaris *et al.*, 2008). Pelo menos dois genes codificantes para DNases extracelulares foram identificados em isolados deste gênero. Enquanto o gene *nucH* codifica para uma DNase extracelular com 114 KDa, cuja sequência de aminoácidos revela que esta enzima não possui homólogas de origem procariótica, a DNase extracelular (25-30 KDa) codificada pelo gene *dns* possui similaridade aminoacídica com DNases extracelulares identificadas em *V. cholerae* (Focareta and Manning, 1987 in Pemberton *et al.*, 1997), *E. coli* (Jekel and Wackernagel, 1995 in Pemberton *et al.*, 1997) e *Erwinia chrysanthemi* (Moulard *et al.*, 1993 in Pemberton *et al.*, 1997).

As DNases extracelulares podem atuar como enzimas alimentares, usadas para obtenção de fósforo e azoto (Pemberton *et al.*, 1997), e proporcionam uma barreira para a entrada de DNA estranho na célula hospedeira, desta forma desempenham importante papel nos mecanismos de defesa microbiana (Kamble and Deshmukh, 2012).

De uma forma geral, estas enzimas também têm sido associadas a mecanismos de fuga às defesas do hospedeiro, estas moléculas possuem a capacidade de degradar as fibras extracelulares libertadas pelos neutrófilos impedindo desta forma a fagocitose. Num processo infeccioso, os neutrófilos são os primeiros fagócitos a serem recrutados para os tecidos infetados. Uma vez no local de infecção, os neutrófilos libertam os grânulos (péptidos antimicrobianos) e fibras que foram redes extracelulares que aderem aos microrganismos facilitando a eliminação dos mesmos. Estas “armadilhas extracelulares” libertadas pelos neutrófilos (NET) são abundantes *in vivo* em casos experimentais de disenterias. As NETs parecem ser uma forma de resposta inata, que se liga microrganismos, impede a sua propagação, e garante uma elevada concentração local de agentes antimicrobianos para degradar fatores de virulência bacterianos e elimina os microrganismos. Histonas e moléculas de DNA constituem os principais componente estrutural destas redes que podem ser desintegradas por desoxirribonucleases (DNases) extracelulares (Brinkmann *et al.*, 2004).

## Elastase

No gênero *Aeromonas* a atividade elastinolítica tem sido associada a uma protease de serina extracelular com 68 KDa, produto do gene *ahyA*, e uma metaloprotease extracelular de 38 KDa codificada pelo gene *ahyB* (Cascón *et al.*, 2000<sup>a</sup>; Cascón *et al.*, 2000<sup>b</sup>).

O produto do gene *ahyB* possui atividades caseinolítica e elastinolítica, e a importância desta protease como um fator de virulência em aeromonas foi demonstrada por Cascón e colaboradores (2000<sup>a</sup>), os ensaios com mutantes isogénicos promoveram um aumento em cem vezes na dose letal (DL<sub>50</sub>) de aeromonas em peixes em relação às estirpes selvagens (Cascón *et al.*, 2000<sup>a</sup>).

Ensaio com mutantes isogénicos revelam que a inativação do gene *ahyA* promove uma redução das atividades caseinolíticas e elastinolíticas em 70% e 25%, respectivamente, em relação à estirpe selvagem. Os resultados obtidos por estes autores sugerem que a atividade caseinolítica é principalmente um resultado da atividade da serina protease AhpA, e que esta protease possui uma fraca atividade elastinolítica (Cascón *et al.*, 2000<sup>b</sup>), no entanto esta protease de serina tem sido associada à aceleração da maturação da elastase AhyB (Cascón *et al.*, 2000<sup>a</sup>).

A função da elastase AhyB em *Aeromonas* spp. ainda não está completamente elucidada, porém a análise das sequências do produto do gene *ahyB* clonado de *A. hydrophila* revelou 52% de identidade

aminoacídica quando comparado com a sequência da elastase (LasB) identificada em *Pseudomonas aeruginosa*, cuja função está bem estudada. LasB é reconhecida como um importante fator de virulência em *P. aeruginosa*. Sob condições experimentais, *in vitro*, LasB degrada numerosos componentes do sistema imunológico, incluindo citocinas e quimiocinas, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-8 (Horvat *et al.*, 1989; Kevin *et al.*, 2003 in Kuang *et al.*, 2011), e péptidos antimicrobianos (Schad *et al.*, 1987 in Kuang *et al.*, 2011).

### **Lipases**

Vários genes codificantes para lipases (ex. *gcat*, *plc*, *lipH3*, *pla*, e *apl-1*) foram identificados no género *Aeromonas* e, os respetivos produtos têm sido reconhecidos como potenciais fatores de virulência (EPA 2006). Algumas estirpes parecem expressar mais que um gene cujo produto possui atividade lipolítica (Merino *et al.*, 1999). Enquanto os produtos dos genes *gcat*, *pla*, *apl-1* e *plc* codificam para fosfolipases, muitas vezes associados a lesões intestinais, os genes *lip* e *lipH3* codificam lipases sem ação fosfolipídica (Lee and Ellis, 1990 in Chacón *et al.*, 2002; Chuang *et al.*, 1997; Merino *et al.*, 1999).

As lipases são classificadas como hidrolases que atuam sobre ligações ésteres, promovendo a hidrólise de triacilgliceróis e libertando ácidos gordos e glicerol. Por um lado, estas enzimas funcionam como enzimas nutricionais na obtenção de compostos como fonte de carbono que podem ser metabolizados pela célula bacteriana (Hedstrom and Nisson, 1975 in Chuang *et al.*, 1997), mas também são apontadas como fatores de virulência por alguns autores, uma vez que a ação destas enzimas leva a um aumento da concentração de ácidos gordos livres que interferem em diversas funções do sistema imunológico (Buttke and Cuchens, 1984, Eftimiadi *et al.*, 1987 in Chuang *et al.*, 1997). As lipases extracelulares mais comumente identificadas em aeromonas são codificadas pelo gene *lipA* e *lipH3* (Chuang *et al.*, 1997) e podem estar presentes em simultâneo numa mesma estirpe potenciando a atividade lipolítica (Merino *et al.*, 1999).

As fosfolipases bacterianas estão envolvidas em processos infecciosos, sendo muitas vezes associadas a lesões intestinais (Gustafson and Taggesson., 1990; Diener *et al.*, 1991 in Merino *et al.*, 1999). As principais fosfolipases identificadas em aeromonas são a fosfolipase C, fosfolipase A1 e a glicerolfosfolípideo-colesterol aciltransferase, produtos dos genes *plc*; *pla* e *gcat*, respectivamente (Merino *et al.*, 1999). A atividade citotóxica de fosfolipase C foi demonstrada em estudos experimentais realizados por Merino *et al.*, (1999) com células Vero (células derivadas de rins do macaco verde africano). Os autores observaram, através de ensaios com mutantes isogénicos, que a inativação do gene *plc* promove um aumento em 10 vezes na dose letal (LD<sub>50</sub>) em peixes e ratos.

A enzima glicerolfosfolípideo-colesterol aciltransferase (GCAT) é uma lipase extracelular identificada em membros de *Aeromonas spp.* e *Vibrio spp.*. Esta possui atividade fosfolipídica na digestão da membrana de eritrócitos, podendo atuar como hemolisina (Lee and Ellis, 1990 in Chacón *et al.*, 2002; Scoaris *et al.*, 2008). O gene que codifica para a enzima GCAT está amplamente disseminado no género *Aeromonas*, e em muitos estudos este gene tem sido utilizado como um marcador molecular do género (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2011; Soler *et al.*, 2002).

### **Flagelos**

*Aeromonas* móveis produzem dois tipos de arranjos flagelares, um flagelo polar expresso constitutivamente (mobilidade do tipo *swimming*) e múltiplos flagelos laterais expressos diferencialmente em superfícies sólidas (mobilidade do tipo *swarming*), ou seja, a expressão destes últimos é induzida em matrizes que não permitem a motilidade por um único flagelo polar, tal como o crescimento em meios sólidos (Naharro *et al.*, 2011). A expressão dos flagelos polares é altamente regulada por uma série de fatores

ambientais, contudo, o mecanismo molecular de inibição de flagelos polares e da via de transdução de sinal de regulação da expressão dos flagelos laterais não é conhecido (Merino *et al.*, 2006).

Apenas um grupo limitado de bactérias é capaz de expressar os dois tipos de sistemas flagelares que inclui *Vibrio parahaemolyticus* (Shinoda and Okamoto, 1977 in Merino *et al.*, 2006), *Vibrio alginolyticus* (Kawagishi *et al.*, 1995 in Merino *et al.*, 2006), *Azospirillum brasilense* (Hall and Krieg 1983 in Merino *et al.*, 2006), *Rhodospirillum centenum* (McClain *et al.*, 2002 in Merino *et al.*, 2006), *Helicobacter mustelae* (O'Rourke *et al.*, 1992 in Merino *et al.*, 2006), *Plesiomonas shigelloides* (Inoue *et al.*, 1991 in Merino *et al.*, 2006) e *Aeromonas* spp. (Kirov *et al.*, 2004; Merino *et al.*, 2006; Sen and Lye, 2007). Estes sistemas flagelares estão bem estudados nas espécies *A. hydrophila* e *V. parahaemolyticus*. Nestas duas espécies, os sistemas de flagelos polares e laterais não parecem partilhar genes estruturais ou de regulação (McCarter, 2004 in Merino *et al.*, 2006).

Em *Aeromonas hydrophila* as subunidades de flagelinas que compõe o flagelo polar estão codificados em 55 genes distribuídos em cinco regiões do cromossoma (Altarriba *et al.*, 2003; Canals *et al.*, 2006<sup>b</sup> in Merino *et al.*, 2006), e os flagelos laterais são codificados por 38 genes distribuídos numa única região (Gavín *et al.*, 2002; Canals *et al.*, 2006<sup>a</sup> in Merino *et al.*, 2006). Neste género bacteriano os flagelos (polares e laterais) funcionam como adesinas permitindo a ligação dos microrganismos às linhagens de células humanas, observado em ensaios experimentais com células Caco-2, HEp-2 e Henle 407 (Kirov *et al.*, 2004; Sen and Lye, 2007). Adicionalmente, os flagelos têm sido descritos como fatores de colonização de diferentes superfícies e formação de biofilmes. O papel multifuncional dos flagelos sugere que estas estruturas podem também ser determinantes de virulência em estirpes enteropatogénicas (Kirov *et al.*, 2004; Sen and Lye, 2007).

### **Sistema de secreção do tipo III**

Um dos possíveis mecanismos envolvidos na patogénese associada a *Aeromonas* é a produção do sistema de secreção tipo III (T3SS) ou injectisoma. Existe uma elevada similaridade estrutural entre o T3SS e o flagelo bacteriano e muitas proteínas estruturais são claramente homólogas. Este sistema é composto por vários anéis, a zona basal está ancorada na membrana interna formando um canal que atravessa a membrana externa e projeta-se para o exterior, desta forma permite a adesão às membranas celulares e injeção de toxinas bacterianas (proteínas efetoras) diretamente no citosol das células hospedeiras (Alberts *et al.*, 2002). Algumas proteínas efetoras secretadas pelo T3SS possuem múltiplas funções biológicas, tais como alterações do citoesqueleto e ativação de cascatas de sinalização intracelular no interior das células do hospedeiro, induzem a lise de células epiteliais hospedeiras e contribuem para a degradação dos tecidos do hospedeiro (Alberts *et al.*, 2002; Krzyminska *et al.*, 2012; Sha *et al.*, 2005). Este sistema de secreção é encontrado em varias espécies enteropatogénicas como *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri* e *Salmonella entérica* (Chacón *et al.*, 2004; Krzyminska *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007), nestas bactérias os genes que compõe o injectisoma estão codificados em ilhas de patogenicidade (Chacón *et al.*, 2004).

Em aeromonas o operão que codifica as proteínas estruturais que compõe o injectisoma pode estar codificado em plasmídeos ou no cromossoma (Sha *et al.*, 2005; Sha *et al.*, 2007; Seshadri, 2006; Yu *et al.*, 2005). Os genes relacionados com o T3SS parecem estar disseminados entre as diferentes espécies de *Aeromonas* (Chacón *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007) e o gene *ascV*, que codifica uma proteína estrutural do sistema de secreção (conservada entre as espécies) e que está inserida na membrana, foi estabelecido como um marcador adequado para a presença de T3SS (Stuber *et al.*, 2003).

Entre as proteínas secretadas pelo T3SS mais estudadas em *Aeromonas* estão as exotoxinas AexT e AexU, estas proteínas efetoras foram identificadas no cromossoma de alguns membros do género *Aeromonas* (Khajanchi *et al.*, 2010; Burr *et al.*, 2003; Sha *et al.*, 2007; Sierra *et al.*, 2007). Possuem homologia significativa com proteínas efetoras do T3SS de *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis* e *Yersinia pestis*. A proteína efectora AexT de *A. salmonicida* é uma toxina bifuncional, que quando ativa catalisa a despolimerização da actina do citoesqueleto, o que resulta em alterações morfológicas celulares, e assim conduz a um efeito citotóxico nas células hospedeiras (Litvak *et al.*, 2007 in Sha *et al.*, 2007), tendo sido associada à inibição da fagocitose de células epiteliais polarizadas e macrófagos (Garrity-Ryan *et al.*, 2000; in Sha *et al.*, 2007), e atividade ADP-ribosiltransferase (Braun *et al.*, 2002 in Sha *et al.*, 2007). Tem sido relatado que toxinas com atividade ADP-ribosiltransferase (Exos e Exot translocadas por T3SS), identificadas em *P. aeruginosa* e que possuem elevada homologia com a AexT, conduzem à apoptose das células hospedeiras (Kaufman *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 2007 in Sha *et al.*, 2007). A toxina AexU possui atividade ADP-ribosiltransferase, e também está associada à inibição da fagocitose e a indução da apoptose em células hospedeiras, desempenhando um papel importante na patogénese do género *Aeromonas* (Khajanchi *et al.*, 2010; Sha *et al.*, 2007).

### **Enterotoxinas**

Diferentes enterotoxinas, com funções distintas, têm sido associadas ao potencial patogénico no género *Aeromonas*: duas citotónicas -Alt e Ast- e três com atividade citotóxica -Act, Aerolisina e HlyA.

As duas enterotoxinas citotónicas (Alt e Ast) identificadas em aeromonas possuem mecanismos de ação semelhantes em células intestinais. Alt é termolábil a 56°C, promove a elevação dos níveis do cAMP e prostaglandinas em células CHO (células ovarianas de hamster chinês) e células do epitélio intestinal resultando na secreção de fluidos a partir de células intestinais de ratos. Ast é termo-estável a 56°C e também promove uma resposta secretória em células intestinais. Ao contrário da toxina Act, as enterotoxinas citotónicas não causam a degeneração das criptas e vilosidades do intestino delgado (James, 2005; Sha *et al.*, 2002).

As enterotoxinas citotóxicas Aerolisina e Act estão intimamente relacionadas do ponto de vista estrutural e funcional e tais semelhanças podem estar relacionadas com a adaptação a determinadas atividades biológicas. Ambas são reconhecidas por alguns autores como toxinas diferentes, no entanto outros autores apoiam a hipótese de estas duas toxinas serem a mesma, a razão para esta última observação reside no facto de terem sido descritas em diferentes espécies e/ou estirpes mas, por apresentarem algumas variações de sequência, não foi ainda possível comprovar se se trata ou não da mesma proteína (Martin-Carnahan e Joseph, 2005).

Pelas razões atrás descritas percebe-se que esta problemática continua em aberto, mas apesar das questões ainda por esclarecer, a enterotoxina Act é consensualmente considerada o mais importante factor de virulência associado ao género *Aeromonas*, havendo vários estudos que a descrevem com algum detalhe. Assim, a enterotoxina Act é constituída por um único polipeptídeo (52 kDa), é secretada pelo sistema de secreção do tipo II (T2SS), possui atividade enterotoxinogénica, hemolítica e citotóxica (James, 2005; Khajanchi *et al.*, 2010), demonstrando reatividade imunológica cruzada com a toxina colérica (James, 2005).

A atividade hemolítica associada a Act envolve a formação de poros na membrana da célula-alvo e influxo de água, resultando na lise celular. Act é ativada após a interação com moléculas de colesterol das membranas dos eritrócitos resultando na oligomerização subsequente e formação de poros nas membranas

(Valério *et al.*, 2010). Adicionalmente, a atividade de Act conduz a danos teciduais e a secreção de fluidos a partir de células do epitélio intestinal, resultantes da indução de uma resposta pró-inflamatória nas células-alvo e regula positivamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas IL-1b e IL-6 nos macrófagos. TNF- $\alpha$  e IL-1b estimulam a produção de radicais livres de oxigénio que tem atividade antimicrobiana e também são responsáveis por danos teciduais no hospedeiro (Valério *et al.*, 2010).

Act tem ainda a capacidade de ativar o metabolismo do ácido araquidónico (AA) em macrófagos que acoplado à via da ciclooxigenase-2 (COX-2) leva à produção de eicosanóides, que são importantes mediadores químicos (por exemplo, a prostaglandina E2 [PGE2]). PGE2 atua como molécula de sinalização, vai ativar indiretamente a adenilato ciclase promovendo o aumento dos níveis de AMP cíclico (cAMP) em macrófagos, simultaneamente promove um aumento da translocação dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e CREB. CREB leva a um aumento da expressão do gene que codifica para Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) em macrófagos, impedindo a ocorrência de apoptose resultante da indução da resposta inflamatória. NF- $\kappa$ B migra para o núcleo e liga-se às regiões promotoras e vão ativar alguns genes de citocinas imunomoduladoras, incluindo o TNF- $\alpha$ , IL-1b e IL-6. A produção de citocinas pró-inflamatórias e radicais de oxigénio provoca uma lesão tecidual extensa em células intestinais. Além disso, PGE2, juntamente com cAMP leva ao estímulo de uma resposta secretória de fluidos (Valério *et al.*, 2010).

Adicionalmente, uma outra hemolisina, HlyA, foi identificada no género *Aeromonas*. Esta hemolisina apresenta uma elevada identidade ao nível das sequências aminoacídica quando comparada com a hemolisina HlyA de *Vibrio cholerae*. HlyA está amplamente disseminada no género *Aeromonas* e é praticamente omnipresente em *A. hydrophila* (Naharro *et al.*, 2011).

Estudos mostram que estas enterotoxinas (Act, Ast e Alt) atuam sinergicamente e estão envolvidas em gastroenterites associadas a *Aeromonas* (Albert *et al.*, 2000; Sha *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003).

### 1.2.3 Perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos

A emergência de resistência bacteriana aos antibióticos representa uma importante ameaça à saúde humana (Walsh *et al.*, 1997). Nos últimos anos, graves surtos de doenças infecciosas causadas por microrganismos resistentes a múltiplos antibióticos ocorreram em vários países (Warren Levinson, 2010). Os principais aspetos que aumentam a probabilidade de seleção de estirpes resistentes incluem a venda dos antibióticos, ao público em geral, sem receita promovendo o uso indevido e indiscriminado dos fármacos; a aplicação de terapia antibiótica quando as infeções são auto-limitantes e a utilização dos antibióticos como promotores de crescimento em rações de animais (Warren Levinson 2010), portanto a exposição ao antimicrobiano ainda é considerada a principal razão para a emergência da resistência.

Em termos gerais, a resistência bacteriana aos fármacos pode ser dividida em resistência intrínseca e resistência adquirida (Koneman *et al.*, 2008). A resistência intrínseca (ou natural) é uma característica inerente às células que impedem a ação do antibiótico e que está presente em praticamente todas as estirpes de uma dada espécie, sendo expressa por genes cromossomais, enquanto a resistência adquirida deve-se a uma modificação genética do microrganismo, na qual estirpes resistentes emergem de populações bacterianas previamente sensíveis, geralmente após exposição ao agente antimicrobiano. A resistência adquirida pode ocorrer quer por mutações cromossomais pontuais ou por aquisição de elementos móveis de DNA (plasmídeos, transposões e integrões) que são reconhecidos como pontos-chaves na emergência de estirpes multirresistentes aos antimicrobianos (Warren Levinson, 2010). Os mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos são complexos e diferentes mecanismos podem estar presentes

numa mesma estirpe promovendo um fenótipo de multirresistência. Os principais princípios básicos dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos estão resumidos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Principais mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos.

Mecanismos	Exemplos de Mecanismos	Exemplos de antimicrobianos inativados
1. Inativação enzimática do antibiótico	Clivagem do anel $\beta$ -lactâmicos por $\beta$ -lactamases (penicilinases cefalosporinases e carbapenemases)	Penicilinas, cefalosporinas, Carbapenêmicos, Monobactâmicos
	Enzimas modificadoras de aminoglicosidos	Aminoglicosidos
2. Modificação do alvo do antibiótico	Alteração pós-tradicional do alvo (ex. fosforilação, adenilação ou acetilação)	Aminoglicosidos, Cloranfenicol
	Mutação na sequência nucleotídicas (ex. DNA girase, Topoisomerase IV)	Quinolonas, Fluoroquinolonas
3. Redução na permeabilidade membranar	Alteração nas proteínas da membrana externa (porinas)	$\beta$ -lactâmicos, Aminoglicosidos, Quinolonas
4. Transporte ativo dos fármacos para o meio extracelular	Ativação de bombas de efluxo	Tetraciclinas, Quinolonas, Sulfonamidas, Trimetoprim

Tabela adaptada. Fontes: Koneman *et al.*, 2008; Warren Levinson, 2010.

As bactérias do gênero *Aeromonas* são reconhecidas como intrinsecamente resistente às penicilinas (penicilina, ampicilina, carbenicilina, e ticarcilina) e cefalosporinas de primeira e segunda geração. Em geral, a maioria das estirpes apresentam perfis de suscetibilidade aos aminoglicosidos, cefalosporinas de terceira e quarta geração, carbapenêmicos, tetraciclina, cloranfenicol, quinolonas e trimetoprim/sulfametoxazol (Martin-Carnahan and Joseph, 2005). No entanto, elevados níveis de resistência a estes agentes anti-bacterianos foram identificados tanto em estirpes clinicas como ambientais de *Aeromonas* (Fosse *et al.*, 2004; Goñi-Urriza *et al.*, 2000; Palu *et al.*, 2006; ko *et al.*, 1998; Vila *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2007).

### **Resistência aos inibidores da síntese da parede celular bacteriana**

Entre os mecanismos de resistência aos diferentes antimicrobianos identificados no do gênero *Aeromonas*, a inativação enzimática dos  $\beta$ -lactâmicos através da expressão de  $\beta$ -lactamases é o mecanismo mais extensivamente estudado. Mecanismos menos frequentes de resistência a estes fármacos têm sido estudados, tais como a limitação do acesso intracelular através da redução da permeabilidade da membrana externa ou da proteção dos alvos dos fármacos. Os  $\beta$ -lactâmicos compõem uma classe de antibióticos que englobam na sua totalidade quatro grupos de antibióticos distintos, como as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenemos, todos interferem na biossíntese da parede celular bacteriana. Devido a baixa toxicidade e elevada eficácia terapêutica compõem um grupo de antibióticos largamente utilizado em terapia antimicrobiana, desta forma os  $\beta$ -lactâmicos constituem um grupo muito importante, uma vez que são amplamente utilizados na clínica (Koneman *et al.*, 2008; Warren Levinson 2010).

No gênero *Aeromonas* há estirpes que produzem enzimas pertencentes a três classes de  $\beta$ -lactamases cromossômicas: metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs); cefalosporinases e penicilinases, pertencentes as classes moleculares de Ambler B, C e D respectivamente (Walsh *et al.*, 1997; Fosse *et al.*, 2004). Análises bioquímicas e genéticas de múltiplas  $\beta$ -lactamases expressas em algumas estirpes apoiam a hipótese de que a expressão dos genes que codificam enzimas pertencentes a estas três classes são coordenados por uma via comum em *Aeromonas*, (Avison *et al.*, 2000; George Jacoby 2009; Walsh *et al.*, 1997). No entanto o mecanismo de indução ainda não está completamente elucidado (Tayler *et al.*, 2010).

As cefalosporinases relacionadas com a família AmpC  $\beta$ -lactamases, são codificadas nos cromossomas de muitas Enterobacteriaceae e têm sido identificadas frequentemente em *Aeromonas*

(Jacoby, 2009; Poole, 2004). Medeiam a resistência à cefalotina, cefazolina, cefoxitina, a maioria das penicilinas. Em muitas bactérias, enzimas AmpC cromossômicas são induzíveis e pode ser expresso em níveis elevados por mutação. No gênero *Aeromonas* as penicilinase  $\beta$ -lactamases classe D hidrolisam preferencialmente penicilinas, em alguns casos, atuam principalmente sobre a oxacilina ou a cloxacilina e são sensíveis a inibidores da  $\beta$ -lactamases como o ácido clavulânico (Avison *et al.*, 2000).

*Aeromonas* produtoras de  $\beta$ -lactamases de largo espectro (ESBLs) têm sido cada vez relatadas nos últimos anos. Estas enzimas conferem resistência a todas as penicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração, sobre as oxiamino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona) e monobactâmicos (aztreonam), mas não possuem atividade contra carbapenêmicos, e são inativadas por inibidores de  $\beta$ -lactamases tais como ácido clavulânico e sulbactam (Girlich *et al.*, 2011; Sturenburg and Mack, 2003; Wu *et al.*, 2011).

Membros do gênero *Aeromonas* têm sido identificados como produtores de metalo- $\beta$ -lactamases e têm atraído a atenção devido à capacidade de hidrolisar carbapenêmicos, como o imipenem e o meropenem. A subclasse dos carbapenêmicos é considerada de maior espectro antibacteriano entre os diferentes antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, com atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas aeróbios e anaeróbios, sendo altamente estável à maioria das  $\beta$ -lactamases incluindo as  $\beta$ -lactamases AmpC e de largo espectro (Livermore *et al.*, 2001). Desta forma, os carbapenêmicos constituem a terapia de escolha para pacientes com infecções hospitalares graves ou para infecções causadas por microrganismos resistentes às penicilinas e cefalosporinas disponíveis (Livermore *et al.*, 2001), e portanto, a resistência aos antimicrobianos pertencentes a esta classe é um fato alarmante e confere um risco emergente para a saúde pública humana.

No gênero *Aeromonas*, os genes que codificam para  $\beta$ -lactamases foram localizados em tanto em cromossomos como em elementos móveis de DNA. A presença destes genes em plasmídeos, transposões e integrões e a grande diversidade de eventos de mobilização torna os membros do gênero *Aeromonas* spp. um veículo para a disseminação de determinantes de resistência no Ambiente (Girlich *et al.*, 2011; Libisch *et al.*, 2008; Neuwirth *et al.*, 2007).

### **Resistência aos inibidores da síntese proteica**

Os antimicrobianos que inibem a síntese de proteínas encontram-se entre as mais amplas classes de antibióticos e podem ser divididos em duas subclasses, que incluem antibióticos cujo alvo é a subunidade ribossomal 30S ou 50S. Entre os inibidores que se associam à subunidade 30S estão as tetraciclina e aminoglicosídeos (ex. estreptomicina, canamicina e gentamicina). Os inibidores da síntese proteica associados ao bloqueio da subunidade ribossomal 50S incluem os macrólidos, lincosamidas, estreptograminas e fenicois (Kohanski *et al.*, 2010).

Os aminoglicosídeos atuam interrompendo a tradução proteica, por outro lado a interação entre aminoglicosídeos e a subunidade 30S do ribossoma pode induzir uma alteração na conformação do complexo formado entre o codão mRNA e o anticodão (aminoacil-tRNA) no ribossoma. Desta forma promovem uma incorporação de aminoácidos inadequados na elongação cadeias peptídicas levando à produção de pequenos péptido instáveis, estes pequenos péptidos acumulam-se nas membranas das células bacterianas promovendo a formação de poros, e portanto, os aminoglicosídeos atuam como bactericidas (Kohanski *et al.*, 2010). Os mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos ocorrem por quatro vias distintas: (1) Modificação dos fármacos por fosforilação, adenilação ou acetilação enzimática, normalmente, os genes que codificam para estas enzimas estão codificados em elementos móveis; (2)

Mutação cromossomal da proteína alvo (nas subunidades ribossomais); e (3) Redução da permeabilidade membranar e (4) transporte ativo do antibiótico para o exterior da célula (Murray *et al.*, 2009; Warren Levinson, 2010).

Os fármacos pertencentes à classe das tetraciclinas são inibidores da síntese proteica através do bloqueio do acesso dos aminoacil-tRNAs à subunidade 30S do ribossoma, funcionando como bacteriostáticos (Kohanski *et al.*, 2010). A expressão de bombas de efluxo é o principal mecanismo de resistência bacteriana a estes antimicrobianos, embora a modificação das sequências das proteínas ribossomais também levem a uma alteração na afinidade das tetraciclinas ao alvo (Warren Levinson, 2010). Adicionalmente algumas bactérias exibem mecanismos de resistência às tetraciclinas por modificação enzimática do fármaco (Murray *et al.*, 2009). Isolados de aeromonas albergando determinantes de resistência à tetraciclina têm sido recuperados de fontes clínicas e ambientais. Os determinantes de resistência à tetraciclina mais frequentemente observados em aeromonas são *tetA* e *tetE* (Schmidt *et al.*, 2001b, Nawaz *et al.*, 2006 in Balassiano *et al.*, 2007), ambos codificam uma bomba de efluxo (Chopra and Roberts, 2001 in Balassiano *et al.*, 2007). Os determinantes *tet* em aeromonas podem ser codificados no cromossoma (Balassiano *et al.*, 2007) ou associados a plasmídeos e transposões (Rhodes *et al.*, 2000, Schmidt *et al.*, 2001<sup>a</sup> in Balassiano *et al.*, 2007; Palu *et al.*, 2006), que provavelmente contribuem para a disseminação da resistência.

O cloranfenicol liga-se ao centro ativo da subunidade ribossomal 50S bloqueando a ação da peptidiltransferase durante a fase de alongamento, o que impede a síntese de novas ligações peptídicas. O mecanismo de resistência ao cloranfenicol mais comum é a expressão de acetiltransferases bacterianas promovendo a inativação enzimática do fármaco. Normalmente, os genes que codificam para acetiltransferases com afinidade para o cloranfenicol estão codificados em plasmídeos ou no cromossoma bacteriano (Warren Levinson, 2010).

### **Resistência aos inibidores de ácidos nucleicos**

O mecanismo de ação dos antimicrobianos pertencentes à classe das sulfonamidas, como o sulfametoxazol consiste em bloquear a síntese do ácido tetraidrofólico, que é um precursor das bases azotadas adenina, guanina e timina e desta forma inibe a síntese de ácidos nucleicos. Do mesmo modo, trimetoprim também inibe a síntese do ácido tetraidrofólico. Ambos os fármacos atuam sinergicamente na mesma via porém os alvos enzimáticos são diferentes. A resistência a esta classe de antibióticos é mediada principalmente por dois mecanismos: (1) sistema de transporte ativo, que exporta o fármaco para o exterior, codificado em elementos móveis e (2) uma mutação cromossomal no gene que codifica para as enzimas alvos do antibiótico (Warren Levinson, 2010).

As quinolonas/fluoroquinolonas são agentes quimioterápicos sintéticos que inibem a DNA topoisomerase II (girase) ou a topoisomerase IV bacterianas, que são necessárias à replicação do DNA, recombinação e reparo, portanto o alvo destas classes de antimicrobianos é a síntese dos ácidos nucleicos e as resistências devem-se principalmente a mutações cromossomais que modificam as topoisomerase II (DNA girase) e IV (Kohanski *et al.*, 2010). A resistência a estes fármacos também pode ser mediada por modificações em proteínas da membrana externa reduzindo a concentração do fármaco no interior da célula bacteriana (Warren Levinson, 2010). Adicionalmente, diferentes variantes de genes codificantes de proteínas de proteção ao alvo têm sido frequentemente identificados em plasmídeos (Goñi-Urriza *et al.*, 2000<sup>a</sup>).

No género *Aeromonas*, o principal mecanismo de resistência ao ácido nalidixico é uma função de uma mutação do *gyrA*, *gyrB* e *parC* (Goñi-Urriza *et al.*, 2002). No entanto, diferentes variantes do plasmídeo

de resistência às quinolonas mediada pelo gene *qnr* (codificam proteínas de à proteção da DNA girase e topoisomerase IV) foram detetados em estirpes de diferentes espécies de *Aeromonas* isoladas de amostras ambientais (Picão *et al.*, 2008, Xia *et al.*, 2010 in Figueira *et al.*, 2011; Cattoir *et al.*, 2008; Goñi-Urriza *et al.*, 2000). O gene *qnrS* é generalizado em águas de diferentes origens (águas residuais, rios, aquicultura), sendo detetado com frequência em isolados de *Aeromonas* e Enterobacteriaceae (Cattoir *et al.*, 2008; Picão *et al.*, 2008).

Grande parte dos dados disponíveis indicam que não há diferenças significativas, nos perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos, entre estirpes pertencentes ao género *Aeromonas* relativamente a origem geográfica dos isolados. Adicionalmente, com exceção das estirpes de *A. trota* e algumas estirpes de *A. caviae*, os perfis de suscetibilidade identificados entre os diferentes isolados de *Aeromonas* parecem ser independentes da designação da espécie (Janda and Abbott, 2010). A Tabela 2 reúne uma compilação de estudos dos perfis de suscetibilidade de *Aeromonas* aos diferentes antimicrobianos comumente avaliados.

**Tabela 2.** Estudos dos perfis de suscetibilidade de isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* aos diferentes antimicrobianos comumente avaliados.

Alvos	Classes	Antibióticos	Percentagem de isolados resistentes (%) aos diferentes antibióticos	
			Ambientais	Clínicos
Inibição da Síntese da Parede	β-Lactâmicos/ inibidores de β-Lactamases	Amoxicilina/ Ac. clavulânico	15(34/220) <sup>e</sup> , 77(38/49) <sup>h</sup> , 50(9/18) <sup>i</sup>	81/(144) <sup>h</sup>
		Ampicilina/ Subactam	72(16/22) <sup>c</sup> , 70(39/55) <sup>g</sup>	98(114/116) <sup>a</sup> , 92(25/27) <sup>d</sup> , 59(13/22) <sup>g</sup>
		Piperacilina/ Tazobactam	59(13/22) <sup>c</sup> , 3(7/220) <sup>e</sup> , 0(0/49) <sup>h</sup> 24(17/72) <sup>j</sup>	10(12/116) <sup>a</sup> , 4(6/144) <sup>h</sup>
		Ticarcilina/ Ac. clavulânico	13,6(3/22) <sup>d</sup> , 22(48/220) <sup>e</sup> , 2(1/49) <sup>h</sup>	100(27/27) <sup>d</sup> , 10(14/144) <sup>h</sup>
	Cefalosporinas	Cefalotina	32(70/220) <sup>e</sup> , 93(128/138) <sup>f</sup> , 14(8/55) <sup>g</sup>	75(87/116) <sup>a</sup> , 100(27/27) <sup>d</sup>
		Cefazolina	91(44/49) <sup>h</sup>	100(27/27) <sup>d</sup> , 91(131/144) <sup>h</sup>
		Cefotaxime	0(0/55) <sup>g</sup> , 11(2/18) <sup>i</sup>	11(13/116) <sup>a</sup> , 0(0/16) <sup>b</sup> , 8(2/22) <sup>g</sup>
		Cefoxitina	24(53/220) <sup>e</sup> , 56(77/138) <sup>f</sup> , 35(17/49) <sup>h</sup>	30(9/27) <sup>d</sup> , 43(9/22) <sup>g</sup> , 35(1/144) <sup>h</sup>
		Ceftazidime	4(9/220) <sup>e</sup> , 0(0/55) <sup>g</sup> , 0(0/49) <sup>h</sup>	17(5/27) <sup>d</sup> , 6(1/22) <sup>g</sup> , 4(6/144) <sup>h</sup>
		Ceftriaxone	5(11/220) <sup>e</sup> , 0(0/49) <sup>h</sup> , 0(0/72) <sup>j</sup>	4(1/27) <sup>d</sup> , 5(7/144) <sup>h</sup>
		Cefuroxima	0(0/220) <sup>e</sup>	11(13/116) <sup>a</sup> , 15(4/27) <sup>d</sup>
	Carbapenémicos	Ertapenem	8(6/72) <sup>j</sup>	-
		Imipenem	1(2/220) <sup>e</sup> , 4(6/138) <sup>f</sup> , 19(14/72) <sup>j</sup>	24(28/116) <sup>a</sup> , 21(78/27) <sup>d</sup>
		Meropenem	0(0/49) <sup>h</sup>	0(0/144) <sup>h</sup>
Monobactâmicos	Aztreonam	14(3/22) <sup>c</sup> , 0(0/220) <sup>e</sup> , 0(0/49) <sup>h</sup>	4(1/27) <sup>d</sup> , 0(0/144) <sup>h</sup>	
	Amicacina	4(1/22) <sup>c</sup> , 6(13/220) <sup>e</sup> , 6(8/138) <sup>f</sup>	3(3/116) <sup>a</sup> , 0(0/27) <sup>d</sup> , 100(144/144) <sup>h</sup>	
Aminoglicósidos	Gentamicina	28(62/220) <sup>e</sup> , 1(1/138) <sup>f</sup> , 0(0/49) <sup>h</sup> , 0(0/18) <sup>i</sup>	7(8/116) <sup>a</sup> , 15(4/27) <sup>d</sup> , 0(0/144) <sup>h</sup>	
	Tetraciclina	9(2/22) <sup>c</sup> , 80(176/220) <sup>e</sup> , 14(19/138) <sup>f</sup> , 9(5/55) <sup>g</sup> , 0(0/49) <sup>h</sup> , 0(0/18) <sup>i</sup>	38(6/16) <sup>b</sup> , 52(14/27) <sup>d</sup> , 24(5/22) <sup>g</sup> , 5(7/144) <sup>h</sup>	
Fenicóis	Cloranfenicol	13(29/220) <sup>e</sup> , 2(3/138) <sup>f</sup> , 0(0/55) <sup>g</sup> , 0(0/18) <sup>i</sup>	31(5/16) <sup>b</sup> , 16(4/27) <sup>d</sup> , 6(1/22) <sup>g</sup>	
Inibição da Síntese de ácidos nucleicos	Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	18(40/220) <sup>e</sup> , 0(0/49) <sup>h</sup>	14(16/116) <sup>a</sup> , 0(0/16) <sup>b</sup> , 0(0/27) <sup>d</sup> , 0(0/144) <sup>h</sup>
		Norfloxacina	16(35/220) <sup>e</sup> , 0(0/49) <sup>h</sup>	0(0/27) <sup>d</sup> , 0(0/144) <sup>h</sup>
	Quinolonas	Ácido nalidíxico	18(4/22) <sup>c</sup> , 59(81/138) <sup>f</sup> , 4(2/49) <sup>h</sup> , 16(3/18) <sup>i</sup>	0(0/16) <sup>b</sup> , 2(3/144) <sup>h</sup>
		Inibidores da via dos folatos	Trimetoprim-sulfametoxazol	36(79/220) <sup>e</sup> , 7(9/138) <sup>f</sup> , 0(0/55) <sup>g</sup> , 0(0/49) <sup>h</sup> , 6(1/18) <sup>i</sup>

Legenda: (a) Wu *et al.*, 2007; (b) Vila *et al.*, 2003; (c) Nagar *et al.*, 2011; (d) Guerra *et al.*, 2007; (e) Dias *et al.*, 2012; (f) Goni-Urriza *et al.*, 2000; (g) Palu *et al.*, 2006; (h) Aravena-romana *et al.*, 2012; (i) Oliveira *et al.*, 2011; (j) Livermore *et al.*, 2001.

## 1.3 Objetivos

O género *Aeromonas* constitui um grupo bastante heterogéneo, exibindo plasticidade metabólica que permite adaptação a diferentes condições ambientais, levando a sua ampla disseminação em diferentes nichos ecológicos (Martin-Carnahan and Joseph, 2005).

Os membros deste género bacteriano são reconhecidos como patogéneos emergentes, responsáveis por uma panóplia de infeções sistêmicas e locais em humanos. A gastroenterite tem sido apontada como manifestação clínica mais comum associada a estas bactérias. No entanto a incapacidade de identificar um surto de diarreia com uma relação clonal e falta de um modelo animal que reproduza fielmente a síndrome diarreica associada, tem levado alguns autores a considerarem que apenas alguns grupos específicos de aeromonas são verdadeiramente enteropatogénicos (Graevenitz, 2007).

Apesar do mecanismo de infeção associado a estes agentes não estar completamente elucidado, muitos fatores de virulência têm sido descritos como marcadores do potencial patogénico. A crescente evidência da existência de estirpes de *Aeromonas* potencialmente patogénicas exibindo resistência à antibióticos clinicamente importantes, tem sido considerada uma ameaça à saúde pública, dado que as infeções causadas por estes microrganismos devem-se principalmente à ingestão de água e/ou alimentos contaminados.

Considerando a importância do género *Aeromonas* como microrganismos patogénicos de origem alimentar o presente estudo visa responder às questões:

- Disseminação dos membros do género *Aeromonas* em diferentes pontos de processamento e distribuição de alimentos;
- Distribuição de fatores de virulência associado aos isolados recuperados de cada um dos ambientes específicos;
- Determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de importância clínica;

Assim, o presente estudo visa contribuir para o aumento do conhecimento geral sobre a ecologia do género *Aeromonas*, detetar variações nos perfis de virulência e resistência a diferentes antimicrobianos e desta forma contribuir para uma melhor avaliação do impacto da possível presença destas bactérias em alimentos/água de consumo humano.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Recolha e processamento das amostras

A recolha das amostras foi realizada numa fábrica de queijos, num matadouro de suínos e num hipermercado. Nestes três locais de amostragem, foram recolhidas amostras alimentares sólidas, amostras líquidas (incluindo água) e amostras de superfícies. Relativamente às amostras de superfícies, estas foram recolhidas ao longo da linha de processamento dos alimentos nos três locais de amostragens. No hipermercado a recolha das amostras de superfícies foi realizada em quatro secções distintas (charcutaria, gastronomia, peixaria e talho) antes e após a higienização das mesmas. A amostragem das diferentes

superfícies foi realizada recorrendo a delimitador de área estéril com 100 cm<sup>2</sup> e as zaragatoas utilizadas foram imersas em uma solução de ringer estéril (1 mL).

A descrição das amostras e os respetivos locais de amostragem são mostrados no Anexo A.

Todas as amostras recolhidas foram mantidas 4°C e transportadas ao laboratório, sendo realizado o processamento em menos de 24 horas após a recolha.

#### Processamento das amostras de superfícies e alimentares

Uma fração representativa de cada amostra foi adicionada assepticamente a uma solução água peptonada tamponada (APT - Scharlau, Barcelona, Espanha), nas proporções descritas na Tabela 3. As soluções foram homogeneizadas num aparelho Stomacher (Stomacher Lab Blender-400) durante um minuto. Após a homogeneização foram realizadas diluições decimais e uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi inoculada à superfície do meio seletivo “*Aeromonas Isolation Medium Base*” – AIMB, suplemento com ampicilina (5 mg/L) – Ryan (OXOID) e incubadas a 30°C durante 24 horas.

**Tabela 3.** Tipo de amostra e respetivos volumes de água peptonada tamponada utilizados na homogeneização.

Amostras	Quantidade de amostra	Água peptonada (mL)
Alimentos sólidos	25 g	225
Alimentos líquidos	25 mL	225
Superfícies	100 cm <sup>2</sup>	100

Na ausência de crescimento característico uma alíquota de 100 µL das amostras enriquecidas (solução mãe, 10<sup>-1</sup>, mantidas a 30°C durante 24 horas) foi novamente inoculada à superfície do meio seletivo (AIMB) e incubadas a 30°C durante 24 horas.

Após o intervalo de tempo de incubação, quatro colónias com características morfológicas típicas de aeromonas (colónias com 0,5-1,5 mm de diâmetro, verdes, opacas e com o centro escuro) foram recolhidas de cada amostra e purificadas por esgotamento do inóculo através de quatro passagens sucessivas em meio seletivo (AIMB).

#### Processamento das amostras de águas

As amostras de águas (2 x 500 mL) foram processadas através do método das membranas filtrantes. Para estas amostras foram utilizadas membranas com porosidade controlada de 0,45 µm (Scharlau, Barcelona, Espanha). Após a filtração, as membranas foram depositadas em placas de petri contendo o meio seletivo (AIMB) e incubadas a 30°C durante 24 horas.

Na ausência de crescimento característico, as membranas submetidas ao pré-enriquecimento em água peptonada tamponada (30 °C/24 horas) foram depositadas à superfície do meio seletivo (AIMB) e incubadas a 30°C durante 24 horas. Para todas as amostras processadas, após o intervalo de tempo de incubação, quatro colónias com características morfológicas de aeromonas (colónias com 0,5-1,5 mm de diâmetro, verdes, opacas e com o centro escuro) foram recolhidas e purificadas por esgotamento do inóculo através de quatro passagens sucessivas em meio seletivo (AIMB).

## 2.2 Identificação ao nível de género

### Triagem fenotípica e conservação dos isolados

As culturas puras foram incubadas em meio não seletivo *Brain Heart Infusion* - BHI (Scharlau, Barcelona, Espanha) durante 24 horas a 30°C, e posteriormente submetidas a uma triagem fenotípica que contemplou a coloração gram, a morfologia das células e a pesquisa das atividades das enzimas citocromo-c-oxidase e catalase. Todos os isolados identificados presuntivamente como membros do género *Aeromonas* foram armazenadas em alíquotas, em BHI contendo 20% de glicerol a - 80°C, e em BHI sólido, pelo método de picada, para uso rotineiro (mantidos a 4°C).

### Identificação molecular ao nível de género

Para identificação molecular dos isolados selecionados após a triagem fenotípica, o DNA foi obtido através da extração direta por fervura com adição de Chelex® 100 (10% de Chelex em TE).

De seguida realizou-se um PCR-duplex, no qual foram utilizados dois conjuntos de *primers* género-específicos. As condições de PCR foram executadas de acordo com o método descrito por Marques (2011) e estão apresentadas na Tabela 2 e informações adicionais no Anexo B. A especificidade da técnica foi avaliada através de ensaios com as estirpes de referência provenientes da coleção de cultura da DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*), *A. bestiarium* 13956<sup>T</sup>; *A. caviae* 7323<sup>T</sup>; *A. enteropelogenes* 6394<sup>T</sup>; *A. hydrophila* 30187<sup>T</sup>; *A. veronii* 7386<sup>T</sup> e *A. schubertii* 4882<sup>T</sup>.

**Tabela 4.** Condições de reação de PCR utilizados na identificação molecular do género.

	Concentrações dos primers	Concentrações dos reagentes	Condições de reação
Identificação ao nível de género	1 µM (GCAT F + GCAT R)	Tampão 1X;	94 °C (5 min),
	1 µM (16S F + 16S R)	MgCl <sub>2</sub> - 1,5 mM; dNTPs - 0,2 mM; Taq 1U	35 x [94 °C (45 sec), 60 °C (45 sec), 72 °C (45 sec)] 72 °C (5 min)

Nota: Concentrações ajustadas para um volume final de 25 µL. As reações de PCR foram realizadas num termociclador (Doppio, VWR, Radnor, Pennsylvania, EUA). Todos os primers utilizados foram obtidos na Eurofins MWG Operon e os demais reagentes na empresa NZYTech, Lda., Lisboa, Portugal.

Aos produtos de amplificação (8 µL) foram adicionados 3 µL de uma solução composta por azul bromofenol e GelRed 40X (iNtRON Biotechnology, Korea) nas proporções 1:1. Seguidamente os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%) em TBE 0,5X (0,1 M Tris, 0,1 M de ácido bórico, 0,2 mM EDTA). Em todos os ensaios de electroforeses o DNA Ladder Plus (1 Kb Plus, Invitrogen, Life Technologies), foi usado como o marcador de massa molecular e os géis foram visualizados num transiluminador de luz UV ImageMaster (PharmaciaBiotech, GE Healthcare, Reino Unido). A reprodutibilidade da técnica foi avaliada através de ensaios adicionais utilizando 10% de réplicas biológicas.

## 2.3 Tipificação genómica

A tipificação genómica foi realizada através da técnica RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), utilizando dois *primers*, 1281 e OPC19, em reações independentes. As condições de PCR estão apresentadas na Tabela 5 e informações adicionais no Anexo B. O DNA foi obtido através da extração direta por fervura com adição de Chelex® 100 (10% de Chelex em TE).

**Tabela 5.** Condições de reação de PCR utilizados na tipificação genómica.

Primers	Concentrações dos primers	Concentrações dos reagentes	Condições de reação
OPC19	1 µM	Tampão 1X; MgCl <sub>2</sub> - 3,5 mM;	94 °C (5 min), 40 x [94 °C (45 sec), 40 °C (60 sec),
1281	1 µM	dNTPs - 0,2 mM; Taq 1U	72 °C (120 sec)] 72 °C (5 min)

Nota: Concentrações ajustadas para um volume final de 25 µL. As reações de PCR foram realizadas num termociclador (Doppio, VWR, Radnor, Pennsylvania, EUA). Todos os primers utilizados foram obtidos na Eurofins MWG Operon e os demais reagentes na empresa NZYTech, Lda., Lisboa, Portugal.

Aos produtos de amplificação (12 µL) foram adicionados 3 µL de uma solução composta por azul bromofenol e GelRed 40X nas proporções 1:1. Seguidamente os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5 %) em TBE 0,5X. Nas electroforeses o DNA Ladder Plus foi usado como o marcador de massa molecular e os géis foram visualizados num transiluminador de luz UV ImageMaster. A reprodutibilidade da técnica foi avaliada através de ensaios adicionais utilizando 10% de réplicas biológicas.

A análise dos perfis de RAPD foi realizada através do software BioNumerics (versão 6.6, Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) e após a normalização dos traços densitométricos, as relações de semelhança foram calculadas usando o coeficiente de correlação de Pearson e o método da média aritmética não ponderada (UPGMA - *unweighted pair-group method with average*).

## 2.4 Avaliação do potencial de patogenicidade

### 2.4.1 Testes em placa

Os ensaios para pesquisa da atividade gelatinolítica foram realizados por inoculação das estirpes por riscado no meio Gelatin Peptone Agar (Liofilchem, Itália). Os resultados foram lidos após 24 horas de incubação a 30°C e adição de solução saturada de sulfato de amónio. A presença de enzimas gelatinolíticas foi revelada pela formação de halos translúcidos.

Os isolados produtores de DNases extracelulares foram reconhecidos através da deteção da degradação de ácido desoxirribonucleico em meio de cultura. Para a pesquisa da atividade DNasica os isolados foram inoculados por riscado em meio D-Nase agar (HI-Media) e incubados durante 24 horas a 30°C. Após o período de incubação a degradação do ácido desoxirribonucleico foi revelada pela adição de 0,01% de azul de toluidina (Merck). A formação de halo rosa a volta do inóculo indica a positividade da prova.

A produção de lipases extracelulares foi avaliada no meio Spirit Blue Agar (Difco, Franklin Lakes, USA), suplementado com banha de porco (comercial). O meio inoculado por riscado foi incubado a 30°C e a leitura dos resultados positivos, para as estirpes produtoras de lipases, pode ser observada após oito horas pela formação de halos transparentes correspondentes à degradação dos lípidos.

A atividade hemolítica foi pesquisada por ensaios em placas de Columbia agar suplementado com sangue de cavalo (5%) - (Biogerm laboratórios, Maia, Portugal). As placas foram inoculadas por riscado e incubadas durante 24 horas a 30°C. As estirpes β-hemolíticas foram identificadas pela observação de uma zona transparente à volta do inóculo resultante da lise total dos eritrócitos, e as estirpes α-hemolíticas foram reconhecidas pela lise parcial dos eritrócitos.

A reprodutibilidade dos ensaios em placa foi avaliada por realização de 10% de réplicas biológicas.

## 2.4.2 Pesquisa dos genes de virulência

Para pesquisa da presença de genes de virulência, o DNA molde utilizado nas reações de PCR foi extraído pelo método do tiocianato de guanidina, a partir de culturas puras, de acordo com adaptação do protocolo descrito por Pitcher *et al.*, (1989).

Os isolados foram examinados quanto à presença de nove genes que codificam para fatores de virulência em *Aeromonas* spp. Foram utilizados *primers* específicos para sequências-alvo dos produtos: elastase (*ahyB*); lipase (*pla/lip/lipH3/alp-1*); flagelinas A e B (*flaA* e *flaB*); proteína estrutural do sistema de secreção do tipo III (*ascV*) e a proteína efectoras (*aexT*);  $\beta$ -hemolisina (*hlyA*); enterotoxinas citotônicas termolábil (*alt*) e termo-estável (*ast*) e enterotoxina citotóxica (*act*).

A pesquisa dos genes de virulência foi realizada em três reações de PCR multiplex definidos com base na temperatura de *annealing* e dimensões dos fragmentos amplificados. As condições de PCR estão apresentadas na Tabela 6 e informações adicionais disponíveis no Anexo B.

**Tabela 6.** Reações de Multiplex-PCR – Concentrações dos reagentes utilizados na pesquisa dos genes de virulência.

	Genes (Locus)	Concentrações dos primers	Concentrações dos reagentes	Condições de reação
Multiplex 1	<i>aexT</i>	1,25 $\mu$ M (aexF + aexR)	Tampão 1X; MgCl <sub>2</sub> - 1,5 mM; dNTPs - 0,2 mM; Taq 1U	94 °C (3 min), 35 x [94 °C (30 sec), 55 °C (60 sec), 72 °C (60 sec)] 72 °C (5 min)
	<i>ahyB</i>	1 $\mu$ M (elaF + elaR)		
	<i>flaA/B</i>	1 $\mu$ M (flaF + flaR)		
	<i>pla/lip/lipH3/alp-1</i>	1 $\mu$ M (lipF + lipR)		
Multiplex 2	<i>hlyA</i>	1 $\mu$ M (ahhF + ahhR)	Tampão 1X; MgCl <sub>2</sub> - 2,5 mM; dNTPs - 0,4 mM; Taq 1U	94 °C (3 min), 35 x [94 °C (30 sec), 62 °C (30 sec), 72 °C (60 sec)] 72 °C (5 min)
	<i>alt</i>	1 $\mu$ M (altF + altR)		
	<i>ascV</i>	1 $\mu$ M (ascF + ascR)		
Multiplex 3	<i>act</i>	0,2 $\mu$ M (actF + actR)	Tampão 1X; MgCl <sub>2</sub> - 1,5 mM; dNTPs - 0,2 mM; Taq 1U	94 °C (5 min), 35 x [94 °C (30 sec), 69 °C (30 sec), 72 °C (45 sec)] 72 °C (5 min)
	<i>ast</i>	0,2 $\mu$ M (astF + astR)		

Nota: Concentrações ajustadas para um volume final de 25  $\mu$ L. As reações de PCR foram realizadas num termociclador (Doppio, VWR, Radnor, Pennsylvania, EUA). Todos os primers utilizados foram obtidos na Eurofins MWG Operon e os demais reagentes na empresa NZYTech, Lda., Lisboa, Portugal.

Aos produtos de amplificação (8  $\mu$ L) foram adicionados 3  $\mu$ L de uma solução composta por azul bromofenol e GelRed 40X nas proporções 1:1. Seguidamente os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%) em TBE 0,5X (0,1 M Tris, 0,1 M de ácido bórico, 0,2 mM EDTA). Em todas as eletroforeses o DNA Ladder Plus (1 Kb Plus, Invitrogen, Life Technologies), foi usado como o marcador de massa molecular e os géis foram visualizados num transiluminador de luz UV ImageMaster (PharmaciaBiotech, GE Healthcare, Reino Unido).

A reprodutibilidade da técnica foi avaliada através de ensaios adicionais utilizando 10% de réplicas biológicas. A estirpe de referência *A. hydrophila* 30187<sup>T</sup> foi utilizada como controlo positivo para os multiplex

2 e 3. Para o multiplex 1 foram utilizados dois controlos positivos, a estirpe de referência 30187<sup>T</sup> para amplificação dos genes *ahyB*, *flaA/B* e *pla/lip/lipH3/alp-1* e o isolado A13 (identificação no Anexo C) para amplificação do gene *aext*.

### 2.4.3 Perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos

A suscetibilidade dos 111 isolados a 16 antibióticos foi avaliada pelo método de difusão em disco segundo o *Clinical Laboratory Standards Institute* (2006). As zonas de inibição foram medidas após 24 horas de incubação a 30 °C. A interpretação dos perfis de suscetibilidade foi realizada de acordo com os *breakpoints* (diâmetro a partir do qual o antimicrobiano atinge a concentração mínima inibitória) definidos para *Aeromonas* spp. que foram previamente estabelecidos pelo CLSI M45-A (2006). Apenas para os antimicrobianos, ácido nalidíxico e norfloxacina foram utilizados *breakpoints* para Enterobacteriaceae definidos no CLSI M100-S18 (2008). Os antibióticos e os respetivos *breakpoints* aplicados estão reunidos na Tabela 7. Para avaliação da reprodutibilidade foram incluídos 10% de réplicas.

**Tabela 7.** Concentrações e os respetivos *breakpoints* (mm) para os 16 agentes antimicrobianos utilizados neste estudo.

Classes	Antibióticos/ Concentração dos discos (µg)	Breakpoints (mm)		
		R	I	S
β-Lactâmicos + inibidores de β-Lactamases	Amoxicilina + Ac. clavulânico (20/10)	≤13	14-17	≥ 18
	Cefotaxime (30)	≤ 14	15-22	≥ 23
Cefalosporinas – 3ª geração	Ceftazidime (30)	≤ 14	15-17	≥ 18
	Ceftriaxone (30)	≤ 13	14-20	≥ 21
	Carbapenémicos	Ertapenem (10)	≤ 15	16-18
Monobactâmicos	Imipenem (10)	≤ 13	14-15	≥ 16
	Aztreonam (30)	≤ 15	16-21	≥ 22
Aminoglicósidos	Amicacina (30)	≤ 14	15-16	≥ 17
	Gentamicina (10)	≤ 12	13-14	≥ 15
Tetraciclina	Tetraciclina (30)	≤ 14	15-18	≥ 19
Quinolonas	Ácido nalidíxico <sup>1<sup>o</sup>G</sup> (30)	≤ 13	14-16	≥ 17
	Ciprofloxacina <sup>2<sup>o</sup>G</sup> (5)	≤ 15	16-20	≥ 21
Fluoroquinolonas	Levofloxacina <sup>3<sup>o</sup>G</sup> (5)	≤ 13	14-16	≥ 17
	Norfloxacina <sup>2<sup>o</sup>G</sup> (10)	≤ 12	13-16	≥ 22
Fenicóis	Cloranfenicol (30)	≤ 12	13-17	≥ 18
Inibidores da via dos folatos	Trimetoprim-sulfametoxazol (1.25/23.75)	≤ 10	11-15	≥ 16

Legenda: S – suscetível; I - intermédio; R - resistente. Todos os discos de antimicrobianos pertencem a marca Oxoid, Basingstoke, Reino Unido.

### 2.4.4 Análise estatística

A análise do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizada para determinar a independência estatística entre os potenciais fatores de virulência dos isolados clínicos e ambientais. O valor de probabilidade (*p-value*) <0,05 foi considerado como estatisticamente significativo (Pestana and Velosa, 2008).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Isolamento e identificação ao nível de género

Uma variedade de meios diferenciais e seletivos têm sido propostos para o isolamento de *Aeromonas* spp. a partir de amostras clínicas, alimentares e ambientais. Entre os meios de cultura que são frequentemente utilizados para o isolamento de bactérias pertencentes a este género, os agentes seletivos normalmente utilizados são antibióticos (ex. ampicilina) e/ou inibidores usados em meios de cultura para seleção de Enterobacteriaceae (ex. sais biliares). Na maioria destes meios é adicionado um único agente diferencial (ex. dextrina, xilose, DNA, ou amido) que permite diferenciar as colónias dos microrganismos com base em características bioquímicas ou no metabolismo de glúcidos (Farmer III *et al.*, 2006). Vários estudos têm sido realizados no sentido de avaliar a melhor utilização dos meios existentes para a recuperação de aeromonas, mas não há um meio único (ou combinação de meios) que tenha recebido aceitação geral (Igbinosa *et al.*, 2012; Naharro *et al.*, 2011). Apesar da falta de consenso, alguns meios de cultura (ex. *Starch glutamate ampicillin penicillin* 10C) têm sido reconhecidos como altamente seletivos para o isolamento de aeromonas a partir de amostras extremamente contaminadas (Igbinosa *et al.*, 2012; Naharro *et al.*, 2011). No entanto, há que ter em conta que, dada a variabilidade fisiológica e metabólica em aeromonas, um meio altamente seletivo possivelmente levaria à inibição de alguns membros deste género.

O meio utilizado no presente estudo, *Aeromonas Isolation Medium Base* (AIMB), foi desenvolvido a partir da formulação descrita por Ryan (1985), sendo uma modificação do meio XLD (xilose, lisina, dextrose) que favorece o crescimento de *Aeromonas* spp, *Plesiomonas* spp., *Pseudomonas* spp. e Enterobacteriaceae. Para melhorar o desempenho no isolamento de *Aeromonas* spp., é recomendada a suplementação com ampicilina na concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup>. Esta concentração está abaixo da concentração mínima inibitória para algumas estirpes de *Aeromonas* a este agente antimicrobiano, permitindo a recuperação de uma maior diversidade.

No presente estudo, um total de 85 amostras provenientes de três locais de amostragem (hipermercado, matadouro de suínos e fábrica de queijos) foram analisadas com o objetivo de avaliar a disseminação de *Aeromonas* spp.. A descrição das amostras e respetivos locais de amostragem estão compilados no Anexo A. O total de isolados recuperados nos diferentes locais de amostragem está resumido na Figura 1.

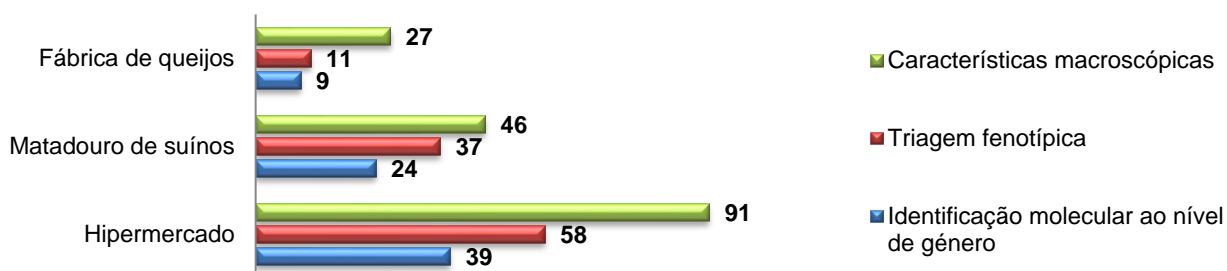
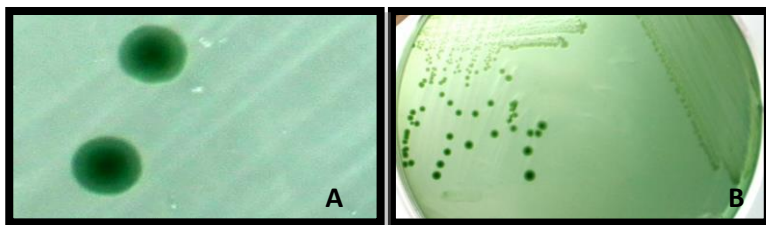


Figura 1. Nº total de isolados recuperados nos diferentes locais de amostragem.

O passo inicial de isolamento foi realizado no meio de cultura AIMB, em seguida, quatro colónias características de aeromonas neste meio (verde escuro, opacas e mais escuras no centro, diâmetro 0,5 -1,5 mm) foram selecionadas a partir de cada amostra. Imagens de colónias características de *Aeromonas hydrophila* estão representadas nas Figuras 2A e 2B.



**Figura 2.** A e B – Colónias características de *Aeromonas hydrophila* em meio seletivo *Aeromonas medium base*.

No total, 164 isolados foram recolhidos e seguidamente purificados em quatro passos de repicagem por esgotamento do inóculo em meio seletivo (AIMB). Os isolados, uma vez em culturas puras, foram cultivados em BHI a 30°C durante 24 horas. Seguidamente foram submetidos a uma triagem fenotípica que contemplou a coloração de Gram, a morfologia das células e a pesquisa das atividades das enzimas citocromo-c-oxidase e catalase. Dos 164 isolados iniciais, após os testes referidos, 106 foram identificados como presuntivamente pertencentes ao género *Aeromonas*.

A identificação molecular ao nível de género envolveu a deteção de dois genes alvos, através da utilização de *primers* género-específicos: Um par de *primers* dirigido para uma região do rRNA16S conservada entre as diferentes espécies do género *Aeromonas* e um segundo par de *primers* dirigido para uma sequência conservada do gene *gcat* (fosfolipase glicerolfosfolípideo-colesterol aciltransferase). No ensaio realizado para avaliação da especificidade da técnica utilizaram-se seis espécies de referência, *A. bestiarium* 3956<sup>T</sup>; *A. caviae* 7323<sup>T</sup>; *A. enteropelogenes* 6394<sup>T</sup>; *A. hydrophila* 30187<sup>T</sup>; *A. schubertii* 4882<sup>T</sup>; *A. veronii* 7386<sup>T</sup> (provenientes da coleção de culturas DSMZ). O amplicão do rRNA16S (521 pb) foi detetado em todas as espécies analisadas, enquanto que o amplicão GCAT (237 pb) não foi detetado em *A. schubertii*.

A ausência do amplicão GCAT no ensaio realizado com a estirpe tipo da espécie *A. schubertii* não invalida a metodologia uma vez que a identificação ao nível do género é garantida pela presença do amplicão rRNA16S.

Para os isolados sujeitos à análise molecular observaram-se dois tipos de resultados: ausência de amplificação (isolados considerados não-aeromonas) e a presença dos dois amplicões, GCAT e RNA 16S. Assim dos 106 isolados submetidos à identificação molecular ao nível de género, 72 foram confirmados como membros do género *Aeromonas*.

Apenas 44% (72/164) dos isolados recolhidos das placas de meio AMIB foram confirmados como pertencentes ao género *Aeromonas*. A elevada percentagem de falsos positivos (56% 92/164) deve-se principalmente às características do meio seletivo. Tal como em todos os meios seletivos, o microbiota de fundo não é completamente inibido. Isto significa que organismos que são muito próximos nas suas características fisiológicas e metabólicas, ocupam os mesmos nichos ecológicos e utilizam os mesmos substratos, crescendo nos mesmos meios e portanto colónias de microrganismos distintos podem apresentar características muito semelhantes em meio seletivo.

No geral, a presença de aeromonas foi registrada em 35% (30/85) das amostras analisadas, das quais 33% (28/85) permitiram o isolamento após o plaqueamento direto em meio seletivo. A prevalência de *Aeromonas* spp. nos diferentes pontos de amostragem está descrita na Tabela 8.

**Tabela 8.** Prevalência de *Aeromonas* spp. nos diferentes locais de amostragem.

	Fábrica - Queijos	Hipermercado (F) (P)	Matadouro - Suínos	
Amostras totais analisadas	26	20	19	20
Amostras positivas p/ <i>Aeromonas</i> spp.	6	13	1	10
Prevalência (%)	23	65	5	50

Legenda: F – amostras coletadas nas secções do talho e peixaria (superfícies e alimentos frescos); P – amostras coletadas nas secções da charcutaria e gastronomia (superfícies e alimentos processados).

A descrição das amostras positivas para presença de aeromonas está apresentada no Anexo A.

No presente estudo, as amostras alimentares provenientes da fábrica de queijos foram negativas para a presença de aeromonas. No entanto algumas amostras de superfície e amostras de água (inclusive tratada) foram positivas. A partir destes dados conclui-se que há uma circulação de bactérias pertencentes a este género bacteriano no ambiente e apesar de não haver evidências da presença de aeromonas nos produtos finais, a presença destes microrganismos em superfícies que contatam direta ou indiretamente com os alimentos, é indicativa de que as superfícies são potenciais fontes de contaminação cruzada.

Relativamente à presença de aeromonas no matadouro de suínos, cerca de 50% (10/20) do total de amostras analisadas foram positivas. A elevada prevalência de microrganismos em ambientes de abate de animais está maioritariamente associada à matéria-prima, principalmente aos gânglios linfáticos, pele, e trato gastrointestinal dos animais, e associada às condições insatisfatórias de higiene durante o processamento desta matéria-prima, o que permite a disseminação dos microrganismos (James, 2005). Apesar dos membros do género *Aeromonas* não serem considerados microrganismos autóctones do microbiota de mamíferos, a constante exposição dos animais a estas bactérias permite uma colonização transitória, fazendo com que os animais atuem como disseminadores deste agente.

A pesquisa da presença de aeromonas num ponto de distribuição de alimentos diretamente para o consumidor foi realizada num hipermercado. As recolhas foram realizadas em duas secções de alimentos frescos (talho e peixaria) e duas secções de alimentos processados e prontos para o consumo (gastronomia e charcutaria). Esta recolha de amostras de superfícies foi realizada antes e depois da higienização do espaço.

A baixa prevalência observada, 5% (1/19), nos ambientes onde há circulação dos alimentos processados está de acordo com relatos de estudos que mostram que a maioria das abordagens modernas para controlar os níveis de contaminação com microrganismos (ex. adição de oxidantes, tratamento térmico, alteração de condições de pH, e adição de NaCl) é eficaz na redução da carga de aeromonas (Daskalov, 2006). Embora não seja frequente, alguns estudos relatam a presença de aeromonas em alimentos processadas (James, 2005). Assim torna-se necessário um estudo mais detalhado neste âmbito, dado que algumas técnicas de processamento de alimentos levam à redução da carga microbiana mas não impedem o posterior desenvolvimento de microrganismos. Não podemos também desprezar a probabilidade de contaminações cruzadas nestes ambientes. A elevada prevalência de aeromonas, 65% (13/20), nas secções onde há circulação de alimentos frescos (talho e peixaria) era esperada, uma vez que a matéria-prima com elevada carga microbiana funciona como disseminador do agente nestes ambientes.

A presença de aeromonas foi também avaliada em algumas superfícies do hipermercado após os procedimentos habituais de higienização. No talho e na peixaria, após a higienização, apenas em duas

superfícies se obtiveram resultados positivos para a presença de aeromonas. Nenhuma amostra proveniente da charcutaria e da gastronomia foi positiva para a presença de aeromonas após a higienização das respectivas superfícies. A redução da prevalência após a higienização das superfícies indica que provavelmente os produtos e processos de higienização nestes ambientes são eficazes, promovendo uma redução significativa na carga de aeromonas.

A presença de aeromonas em todos os locais de onde foi realizada a recolha de amostras reflete a ampla disseminação do género. No entanto, é importante frisar que os isolados foram maioritariamente recuperados de locais onde há circulação de alimentos frescos (talho, peixaria e matadouro de suínos). Este dado reflecte a constante exposição dos animais, que são utilizados na alimentação humana ao agente microbiano, e desta forma estes animais atuam como um veículo de disseminação de estirpes de *Aeromonas* nestes ambientes. A ausência de isolados de aeromonas em amostras de alimentos prontos para o consumo humano é um indicativo de que as técnicas utilizadas para controlar os níveis de contaminação, nesta categoria de alimentos, são eficazes na redução significativa da carga microbiana. No entanto, a circulação de aeromonas nestes ambientes associada a práticas de higiene insatisfatórias pode conduzir à contaminação após o processamento do alimento.

A alta prevalência ambiental de *Aeromonas* spp. tem sido considerada por alguns autores como uma importante ameaça à saúde pública, uma vez que infeções associadas a estas bactérias são adquiridas principalmente através do consumo de água e alimentos contaminados. De forma a auxiliar a melhor compreensão do potencial perigo associado à exposição constante ao género *Aeromonas*, foram integrados na coleção, isolados de diferentes origens. Assim, um total de 120 isolados, incluindo isolados de água de consumo humano, água não tratada, sedimentos, alimentos, amostras clínicas e de fezes de indivíduos saudáveis. Estes isolados foram fornecidos por laboratórios colaboradores em diferentes países (Bangladesh; Bélgica; Brasil; Dinamarca; Portugal; Tailândia e Vietnam). Estes isolados foram anteriormente identificados a nível de espécie nos laboratórios de origem.

Aos 72 isolados de *Aeromonas* spp. identificados a nível de género no decorrer do presente trabalho foram ainda adicionados oito isolados provenientes do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) e 18 isolados de águas residuais provenientes da Empresa Portuguesa de Águas Livres (EPAL), todos identificados ao nível de género.

A coleção inclui também as seis estirpes de referência referidas anteriormente - *A. bestiarum* 13956<sup>T</sup>; *A. caviae* 7323<sup>T</sup>; *A. enteropelogenes* 6394<sup>T</sup>; *A. hydrophila* 30187<sup>T</sup>; *A. veronii* 7386<sup>T</sup> e *A. schubertii* 4882<sup>T</sup>.

### 3.2 Tipificação genómica

Uma elevada variedade de métodos moleculares de tipificação genómica têm sido utilizados para identificação e/ou diferenciação de isolados de *Aeromonas*. Entre os vários métodos, RAPD-PCR (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) e Rep-PCR (*repetitive element*), têm sido muito utilizados em estudos de diversidade genómica devido à simplicidade de execução e rapidez na obtenção de resultados. A técnica RAPD-PCR baseia-se na utilização de um único *primer* de sequência gerada aleatoriamente, e associado a baixas condições de restringência permite a amplificação de fragmentos de DNA distribuídos aleatoriamente pelo genoma. A técnica Rep-PCR recorre à utilização de *primers* dirigidos para sequências existentes e

repetidas em diferentes regiões do cromossoma bacteriano. Deste último conjunto fazem parte as sequências ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*), M13 (derivada da sequência “core” do bacteriófago M13) e REP (*repetitive extragenic palindrome*) (Khajanchi *et al.*, 2010; Pablos *et al.*, 2011; Sinha *et al.*, 2004; Szczuka and Kaznowski, 2004; Tacão *et al.*, 2005).

Apesar desta diversidade de técnicas, o princípio é o mesmo. O resultado é a amplificação de um conjunto de fragmentos de DNA polimórficos, característicos de um determinado microrganismo e muitas vezes os métodos são usados em combinação, a fim de se alcançar um maior poder discriminante.

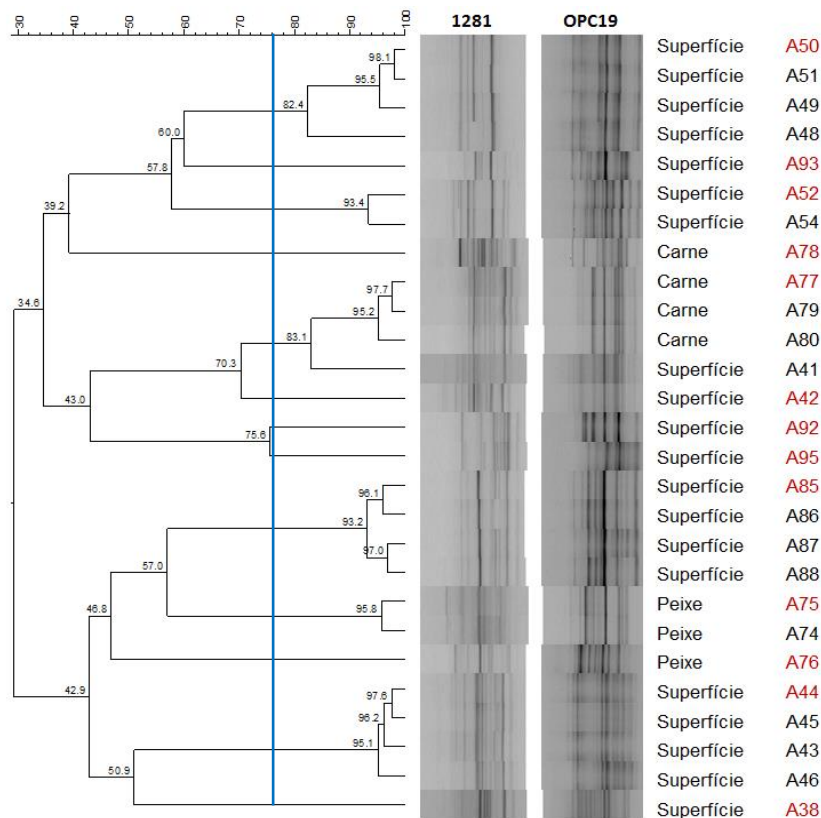
Na presente investigação, a eficácia das técnicas de tipificação – RAPD-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR e M13-PCR - foi avaliada em ensaios independentes, com as estirpes de referência da coleção em estudo. Os resultados obtidos revelaram que os perfis de RAPD exibiram um maior número de fragmentos amplificados e portanto, provavelmente possui um maior poder discriminante comparativamente com as demais técnicas analisadas.

Desta forma, os isolados da coleção em estudo (N = 218) foram submetidos à tipificação genómica recorrendo ao método RAPD-PCR com dois *primers*, 1281 e OPC19 (em reações de amplificação independentes). Embora os perfis obtidos possam fornecer informação redundante, uma análise conjunta leva ao aumento do poder discriminante da técnica, ampliando a sensibilidade na distinção dos grupos genómicos. Com objetivo de avaliar a reprodutibilidade da técnica 10% de réplicas biológicas foram analisados em ensaios independentes.

A análise conjunta dos perfis RAPD obtidos foi avaliada no software BioNumerics e após a normalização dos traços densitométricos, as relações de semelhança foram calculadas usando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração baseado na média aritmética não ponderada (UPGMA). A construção de dendrogramas de similaridade foi realizada para cada grupo de isolados, consoante o tipo de amostra e local de origem (Ex. fábrica de queijos, matadouro de suínos, hipermercado, amostras clínicas). Adicionalmente, procedeu-se à construção de um dendrograma com os perfis RAPD obtidos para as réplicas e os respetivos isolados “originais”, tendo sido observado nível de semelhança de 76%. Desta forma, todos os isolados de um *cluster* formado a níveis superiores ao nível de reprodutibilidade (76%) foram considerados muito semelhantes do ponto de vista genómico e portanto apenas um isolado de cada um destes *clusters* foi selecionado como representante para estudos subsequentes.

A análise dos diferentes dendrogramas permitiu a seleção de 111 isolados representantes para avaliação do potencial patogénico através da pesquisa dos fatores de virulência e avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Os isolados representantes da coleção em estudo estão identificados no Anexo C.

A título exemplificativo, um dos dendrogramas construídos com base na análise dos perfis RAPD está representado na Figura 3.



**Figura 3.** Dendrograma de similaridade genómica obtido a partir dos perfis de RAPD-PCR de 38 isolados de *Aeromonas* spp. provenientes do hipermercado. As relações de semelhanças foram calculadas usando o coeficiente de correlação de Pearson e os *clusters* formados através do método média aritmética não ponderada (UPGMA). Linha azul: nível de reprodutibilidade (76%). A vermelho: Isolados selecionados para avaliação do potencial patogénico.

Na técnica de RAPD, a temperatura de hibridação utilizada é suficientemente baixa (40°C) de modo a permitir que o *primer* hibride com o DNA molde mesmo não existindo homologia total entre ambos. O número de cópias de cada sequência depende da eficiência com que o *primer* se liga a cada par de locais, dependendo do grau de homologia entre o *primer* e DNA alvo. Estas características possibilitam a utilização desta técnica em qualquer DNA alvo, já que não existe necessidade de conhecimento prévio do genoma em estudo. No entanto as baixas condições restritivas de PCR, provocadas pela pequena dimensão do *primer* e baixa temperatura de hibridação tornam estas técnicas muito sensíveis a fatores externos (ex. pequenas oscilações de temperatura, variações na razão DNA/*primers*, refletindo-se numa baixa reprodutibilidade (Szczyka and Kaznowski, 2004).

Desta forma, o baixo nível de reprodutibilidade observado (76%) deve-se a algumas variações dos perfis de RAPD-PCR entre as réplicas e os respetivos “originais”. No entanto, uma vez que a técnica é altamente sensível a erros, podemos inferir que isolados que se agrupam a níveis de semelhança muito elevados são de facto muito semelhante do ponto de vista genómico. Portanto a técnica utilizada, garante que não houve perda de diversidade na seleção dos isolados representantes para avaliação do potencial de patogenicidade.

### 3.3 Potencial de patogenicidade

#### 3.3.1 Fatores de virulência

Embora o papel do género *Aeromonas* como agentes etiológicos de gastroenterite ainda não esteja claramente compreendido, muitos fatores de virulência têm sido descritos como marcadores do potencial

patogénico destas bactérias. Assim, a presença de genes associados à virulência, cuja importância foi observada anteriormente (Rabaan *et al.*, 2001; Cascón *et al.*, 2000; Kirov *et al.*, 2004; Sha *et al.*, 2002), foi analisada entre os isolados em estudo. Nove genes de virulência foram pesquisados utilizando *primers* específicos para a enterotoxina citotóxica (*act*); proteína efetora do sistema de secreção do tipo III (SST3) (*aexT*); elastase (*ahyB*); enterotoxina citotónica termolábil (*alt*); proteína estrutural do SST3 (*ascV*); enterotoxina citotónica termo-estável (*ast*); flagelinas A e B (*flaA/B*); hemolisina (*hlyA*) e lipases (*pla/lip/lipH3/alp-1*). Adicionalmente, realizaram-se ensaios em placa para a pesquisa das atividades DNasica, gelatinolítica, lipolítica e hemolítica. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 9.

Como já foi referido, para a análise dos resultados foi realizado um tratamento estatístico utilizada para determinar a independência estatística entre os potenciais fatores de virulência dos isolados clínicos e ambientais.

**Tabela 9.** Número total de isolados positivos para a presença de potenciais fatores de virulência.

Total de isolados	Nº total de isolados/Genes de virulência									Nº total de isolados/ Expressão fenotípica				
	<i>act</i>	<i>aexT</i>	<i>ahyB</i>	<i>alt</i>	<i>ascV</i>	<i>ast</i>	<i>flaA/B</i>	<i>hlyA</i>	<i>lip</i>	DNase	GEL	LIPA	HEM	
Isolados de Portugal	<u>Ambientais</u>													
	N = 64	40	6	37	30	5	6	28	21	32	56	63	50	63
	<u>Clínicos</u>													
	N = 5	4	2	2	2	3	1	2	1	2	5	5	1	5
Isolados de laboratórios colaboradores	<u>Ambientais</u>													
	N = 22	13	3	14	15	4	0	12	12	16	17	19	5	22
	<u>Clínicos</u>													
	N = 20	6	3	7	12	5	1	6	6	9	18	16	13	20

Legenda: Genes de virulência: ***act*** (enterotoxina citotóxica, β-hemolisina); ***aexT*** (proteína efetora do sistema de secreção do tipo III – ADP-ribosina); ***ahyB*** (elastase); ***alt*** (enterotoxina citotónica termolábil); ***asc*** (proteína estrutural do sistema de secreção do tipo III); ***ast*** (enterotoxina citotónica termo-estável); ***flaA/B*** (flagelinas A e B); ***hlyA*** (β-hemolisina); ***lip*** (lipases e fosfolipases - *pla/lip/lipH3/alp-1*). Expressão fenotípica: DNases; GEL (gelatinase); LIPA (lipase) e HEM (hemolisinas).

Cerca de 87% (96/111) dos isolados foram identificados como produtores de DNases extracelulares pela observação de halos rosa à volta do inóculo, resultante da degradação de ácido desoxirribonucleico no meio de *D-Nase agar*. A elevada percentagem de produtores de DNases extracelulares está de acordo com estudos realizados por outros autores (Chacón *et al.*, 2003; Nagar *et al.*, 2011). Embora o papel das DNases extracelulares de aeromonas, no processo infeccioso, ainda não tenha sido confirmado experimentalmente, relatórios de estudos anteriores sugerem, a participação destas enzimas na patogénese (Pemberton *et al.*, 1997; Scoaris *et al.*, 2008). Os dados do presente estudo revelam que as DNases extracelulares estão altamente disseminadas no género *Aeromonas* e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na atividade enzimática entre isolados clínicos e ambientais.

A produção de lipases extracelulares foi avaliada no meio *Spirit Blue Agar* e os resultados positivos foram observados em 62% (69/111) dos isolados. Relativamente à pesquisa de genes codificantes para lipases/fosfolipases entre os isolados representantes, os *primers* utilizados nas reações de PCR foram desenhados para sequências conservadas entre quatro genes codificantes para lipases e fosfolipases (*pla/lip/lipH3/alp-1*) (Sen and Rodgers, 2004). Na presente investigação, os *primers* selecionados permitiram a amplificação de bandas com massa molecular correspondente ao amplicão esperado (aproximadamente

380 pb) em 53% (59/111) dos isolados. Estes resultados estão de acordo com a observada pelos autores Sen e Rodgers (2004).

Relativamente à atividade lipolítica, observadas entre isolados clínicos 56% (14/25) e ambientais 64% (55/86), as diferenças observadas não são estatisticamente significativas. No entanto, a prevalência do amplicão (*pla/lip/lipH3/alp-1*) foi estatisticamente superior nos isolados ambientais 56% (48/86) comparativamente com os isolados clínicos 44% (11/25).

Correlacionado o fenótipo lipolítico dos isolados com a presença do amplicão *pla/lip/lipH3/alp-1*, foi possível observar concordância em 74% (82/111) dos isolados. Relativamente aos 26% (29/111) de discordâncias observadas entre as duas abordagens deve-se ter em consideração que, em geral, os ensaios fenotípicos têm várias limitações. Muitas bactérias podem alterar a expressão do gene, o que pode ocorrer de forma espontânea ou em resposta a diferentes estímulos ambientais. Por outro lado, a presença da atividade enzimática na ausência do amplicão esperado pode ser explicada pela possível presença de outros genes codificantes de lipases/fosfolipases não pesquisados no presente estudo.

A expressão fenotípica de proteases extracelulares foi revelada pela observação de halos translúcidos no meio *Gelatin Peptone Agar*. Cerca de 90% (103/111) dos isolados foram identificados como produtores de proteases extracelulares capazes de degradar a gelatina. Resultados semelhantes foram obtidos por Nagar *et al.*, (2011). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre isolados clínicos e ambientais relativamente a atividade de proteases extracelulares.

O género *Aeromonas* tem sido caracterizado como produtor de uma vasta gama de proteases extracelulares (metaloproteases, proteases de serina, e aminopeptidases) capazes de degradar as proteínas biológicas complexas presentes no tecido conjuntivo e soro, incluindo fibrinogénio,  $\gamma$ -imunoglobulina, albumina, elastina e colagénio (Janda and Abbott, 2010; Zacaria *et al.*, 2009). Embora tenham sido na sua generalidade identificadas como potenciais fatores de virulência (Zacaria *et al.*, 2009), apenas algumas proteases extracelulares de aeromonas têm sido intensivamente estudadas, como as elastases AhyA e AhyB (Cascón *et al.*, 2000<sup>a</sup>; Cascón *et al.*, 2000<sup>b</sup>). No presente estudo, o gene da protease elastase AhyB foi identificado em 54% (60/111) dos isolados. Esta frequência observada é inferior à descrita pelos autores Sen e Rodgers (2004), Guerra *et al.*, (2007). Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre isolados clínicos 36% (9/25) e ambientais 59% (51/86).

Os amplicões correspondentes aos genes *flaA/B* foram identificados em 43% (48/111) dos isolados. Embora, a prevalência dos genes *flaA/B* tenha sido superior nos isolados ambientais 47% (40/86) comparativamente com os isolados clínicos 32% (8/25), não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas. Estas estruturas responsáveis pela locomoção de muitas bactérias, respondem a estímulos sensoriais (quimiotaxia) (Merino *et al.*, 2006), permitindo a locomoção em direção a novos substratos e portanto conferem uma vantagem adaptativa na colonização de diferentes ambientes. Desta forma, os flagelos polares permitem a colonização de diferentes nichos, inclusive a colonização dos tecidos do hospedeiro embora não sejam suficientes para o desenvolvimento do processo infeccioso.

Relativamente ao sistema de secreção do tipo III (SST3), a prevalência observada para o gene *ascV* foi de 15% (17/111) e o gene *aext* foi identificado em 13% (14/111) dos isolados. A distribuição dos genes *ascV* e *aext*, em termos gerais, apresentou maior frequência em isolados clínicos, o gene *ascV* foi detetado 32% dos isolados clínicos enquanto que 20% apresentaram amplificação o gene *aext*. A frequência de ambos os genes foi de 10% entre os isolados ambientais. De fato, é expectável uma maior prevalência do SST3 entre os isolados clínicos, dada a sua correlação com a patogenicidade.

Quanto às enterotoxinas, a baixa frequência observada para o gene *ast* 7% (8/111) entre os isolados de *Aeromonas* analisados neste estudo é semelhante ao relatado em estudos realizados por Kingombe *et al.*, (2010) e Wu *et al.*, (2007) mas contrasta com a alta frequência relatada por Sen e Rodgers (2004) e Albert *et al.*, (2000). Albert *et al.*, (2000) sugerem que estas diferenças observadas nas frequências do gene *ast* podem estar relacionadas com questões geográficas. No presente estudo não observamos predominância do gene em nenhum ambiente específico e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre isolados clínicos 8% (2/25) e ambientais 7% (6/86).

O gene *alt* foi identificado em 53% (59/111) dos isolados. Esta frequência observada é semelhante a que foi relatada em estudos realizados por Kingombe *et al.*, (2010) e Wu *et al.*, (2007), Sen e Rodgers (2004) e Albert *et al.*, (2000). No presente estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre isolados clínicos 56% (14/25) e ambientais 52% (45/86).

A pesquisa da atividade hemolítica foi realizada no meio Columbia Agar suplementado com sangue de cavalo (5%). Cerca de 99% (110/111) isolados apresentaram um fenótipo hemolítico (30°C). Variações nos tipos de hemólise foram observadas ( $\alpha$ -hemólise e  $\beta$ -hemólise), apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas entre os isolados clínicos e ambientais ( $p < 0,05$ ). A elevada frequência de isolados produtores de hemolisinas observada neste estudo está de acordo com relatos anteriores (Brenden and Janda, 1987; Guerra *et al.*, 2007; Nagar *et al.*, 2011).

No género *Aeromonas*, estão descritas uma grande variedade de genes codificantes para toxinas hemolisinas e fosfolipases que conduzem à lise de eritrócitos. No presente estudo, foram pesquisados os genes para hemolisinas - *act* e *hlyA*. Aproximadamente 55% (62/111) dos isolados apresentaram o gene *act* e para o gene *hlyA* a frequência observada foi de 36% (40/111). Em cerca de 63% (70/111) dos isolados foram identificados pelo menos um dos genes (*act* e/ou *hlyA*). Nossos resultados são semelhantes aos relatados por Kingombe *et al.*, (1999), Sen e Rodgers (2004) e Nagar *et al.*, (2011). A frequência observada para o gene *act* foi superior nos isolados ambientais 61% (53/86) quando comparado com a frequência observada para os isolados clínicos 40% (10/25). Da mesma forma, a frequência observada para o gene *hlyA* foi superior entre os isolados ambientais 38% (33/86) quando comparado com os isolados clínicos 24% (7/26)

Embora a presença dos genes codificantes para hemolisinas tenham sido identificados em 63% dos isolados, apenas um dos isolados não apresentou um fenótipo hemolítico, ou seja, em 27% dos isolados hemolíticos não foram identificados os genes *act* ou *hlyA*. Estas discrepâncias podem ser explicadas pela existência de outras hemolisinas cujos genes não foram pesquisados no presente estudo.

Entretanto, o gene *gcat* que tem sido utilizado como um marcador molecular ao nível de género (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2011; Soler *et al.*, 2002), também tem sido apontando como um factor de virulência. Este gene codifica para a enzima glicerolfosfolipídeo-colesterol aciltransferase que possui atividade fosfolipídica na digestão da membrana de eritrócitos, podendo atuar como hemolisina (Lee and Ellis, 1990 in Chacón *et al.*, 2002; Scoaris *et al.*, 2008).

No presente estudo, a identificação molecular ao nível de género envolveu a detecção de dois genes alvos, o rRNA16S e o gene *gcat*, ambos amplificados com *primers* desenhados para sequências conservadas entre as espécies de *Aeromonas*. Os resultados observados mostram que o *gcat* está altamente disseminado, tendo sido detetado em todos os isolados cujo amplicão do gene rRNA16S também foi observado. Considerando a elevada disseminação do gene *gcat* entre os isolados em estudo e ao fato do produto deste gene estar associado à lise de eritrócitos, podemos inferir que a fosfolipase GCAT pode estar a contribuir para os fenótipos hemolíticos observados.

### 3.3.2 Perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos

O perfil de suscetibilidade dos 111 isolados em estudo foi avaliado pelo método de difusão segundo o *Clinical Laboratory Standards Institute* (2006). Para esta análise foram selecionados 16 antibióticos representantes de diferentes classes e com diferentes alvos na célula bacteriana (Materiais e métodos - Tabela 7). A interpretação dos perfis de suscetibilidade foi realizada de acordo com os *breakpoints* definidos para *Aeromonas* spp. previamente estabelecidos pelo CLSI M45-A (2006). Apenas para os antimicrobianos, ácido nalidíxico e norfloxacin foram utilizados *breakpoints* para Enterobacteriaceae definidos no CLSI M100-S18 (2008). Os perfis de suscetibilidade dos isolados em estudo estão apresentados no Anexo D e os resultados globais dos perfis estão organizados na Tabela 10. Em termos gerais, aproximadamente 38% dos isolados apresentaram um fenótipo de suscetibilidade a todos os antibióticos analisados.

**Tabela 10.** Número total de isolados de *Aeromonas* spp. com resistência aos antimicrobianos analisados neste estudo.

Origem dos isolados	Antibióticos																
	AMC	CTX	CAZ	CRO	ETP	IPM	ATM	AK	CN	TE	NA	CIP	LEV	NOR	C	STX	
Portugal	Fábrica de queijo (N= 8)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Hipermercado (N= 20)	6	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0	
	Matadouro (N= 19)	15	0	0	0	5	0	0	2	0	3	0	0	0	0	1	
	EPAL (N= 13)	6	0	0	0	0	0	0	0	3	8	1	0	4	0	2	
	INSA (N= 4)	3	3	0	3	1	0	3	0	0	2	0	0	0	0	0	
	Clinica (N= 5)	1	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	
Outros países	Ambientais (N= 22)	2	1	1	0	0	0	3	1	0	4	7	0	0	5	3	
	Clinica (N= 20)	6	1	3	2	0	0	1	1	3	5	8	0	0	1	1	
Total N= 111		40	5	4	5	6	0	7	4	3	19	32	1	0	4	6	5

Legenda: AK – amicacina; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; ATM – aztreonam; C – cloranfenicol; CAZ – ceftazidima; CIP – ciprofloxacina; CN – gentamicina; CRO – ceftriaxona; CTX – cefotaxima; ETP – ertapenem; IMP – imipenem; LEV – levofloxacina; NA – ácido nalidíxico; NOR – norfloxacin; STX - trimetoprim/sulfametoxazol e TE – tetraciclina.

INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

EPAL - Empresa Portuguesa de Águas Livres

Relativamente à resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, a associação dos antimicrobianos amoxicilina/ácido clavulânico apresentou maior eficácia contra os isolados de *Aeromonas* analisados, cerca de 36% (40/111) dos isolados apresentaram fenótipo de resistência a este antimicrobiano. A resistência observada no presente estudo para esta associação  $\beta$ -lactâmicos/inibidor de  $\beta$ -lactamases, está de acordo com os estudos realizados por Dias *et al.*, (2012). Em contraste, outros estudos revelam níveis de resistências elevados (Vila *et al.*, 2003; Saavedra *et al.*, 2004). Era esperado que a associação de um antimicrobiano pertencente a uma destas subclasses de  $\beta$ -lactâmicos a um inibidor de  $\beta$ -lactamases promovesse uma potencialização da eficácia dos fármacos. A observação de cerca de 36% de isolados resistentes pode dever-se ao fato de que muitas bactérias desenvolvem múltiplos mecanismos de resistências que são, com frequência, complementares (Koneman *et al.*, 2008).

De acordo com os resultados reportados anteriormente por Aravena-romana *et al.*, (2012), Dias *et al.*, (2012), Nagar *et al.*, (2011) e Wu *et al.*, (2007), o presente estudo, aproximadamente 4% (5/111) dos isolados apresentaram um perfil de resistência às cefalosporinas 3<sup>ª</sup>G (cefotaxime, ceftazidime e ceftriaxone) e cerca de 6% (7/111) dos isolados apresentaram resistência ao aztreonam. A resistência aos antimicrobianos carbapenémicos foi analisada através da avaliação dos perfis de suscetibilidade ao

ertapenem e imipenem. Nenhum dos isolados em estudo apresentou um perfil de resistência ao imipenem, enquanto para o ertapenem a resistência observada foi de 5% (6/111). No género *Aeromonas*, a resistência aos carbapenémicos tem sido relatada em isolados com diferentes origens (Dias *et al.*, 2012; Goni-Urriza *et al.*, 2000; Livermore *et al.*, 2001).

Dentro da classe dos aminoglicosídeos foram observados fenótipos de resistência para a gentamicina - 3% (3/111) e amicacina - 4% (4/111). Em vários estudos é referida a resistência de *Aeromonas*, com diferentes origens, aos aminoglicosídeos (Dias *et al.*, 2012; Goñi-Urriza *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 2007; Palú *et al.*, 2006). No entanto, em geral, os níveis de resistência observados para esta classe de antimicrobianos são baixos. Os mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos podem desenvolver-se por mutações nos alvos dos fármacos, redução da permeabilidade membranar, transporte ativo do antibiótico para o exterior da célula ou por modificação enzimática do antibiótico, sendo este último o mecanismo mais comum de resistência aos aminoglicosídeos (Warren Levinson, 2010). No género *Aeromonas* a resistência aos aminoglicosídeos tem sido associada à modificação enzimática do antibiótico por ação das enzimas aminoglicosídeo 3'-adeniltransferase e aminoglicosídeo-(6')-N-acetiltransferase codificadas pelos genes *aadA* e *aac(6')-Ib-cr*, respectivamente. Em *Aeromonas*, estes genes de resistência aos aminoglicosídeos têm sido identificados em elementos móveis de DNA (Henriques *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2007).

Os níveis de resistência observados para a tetraciclina foram relativamente elevados, cerca de 17% (19/111) de todos os isolados analisados apresentaram um fenótipo de resistência a este antimicrobiano. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Goni-Urriza *et al.*, (2000) e Palu *et al.*, (2006) mas abaixo dos observados por outros autores (Vila *et al.*, 2003; Guerra *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2012). Os elevados níveis de resistência à tetraciclina, têm sido associados à utilização de tais agentes antimicrobianos para a prevenção e tratamento de doenças em humanos e animais (Goñi-Urriza *et al.*, 2000). Há várias décadas, a tetraciclina tem sido amplamente utilizada em clínica humana, veterinária e agricultura (Gilchrist *et al.*, 2007), contribuindo para níveis mais elevados de resistência microbiana, especialmente entre o género *Aeromonas* (Goñi-Urriza *et al.*, 2000). Como consequência, estirpes de *Aeromonas* tolerantes as tetraciclinas têm sido cada vez mais isoladas de fontes clínicas e ambientais. Entre os principais mecanismos de resistência às tetraciclinas o mais comum é o efluxo ativo destes fármacos. Genes codificantes de determinantes de resistência às tetraciclinas, em *Aeromonas*, têm sido identificados em elementos móveis e no cromossoma bacteriano (Balassiano *et al.*, 2007; Henriques *et al.*, 2008) e os determinantes mais frequentemente observados codificam para bombas de efluxo (Chopra and Roberts, 2001 in Balassiano *et al.*, 2007).

No geral, a frequência da resistência observada para o cloranfenicol foi de 5% (6/111), esta baixa frequência é coincidente com os resultados apresentados por outros autores (Vila *et al.*, 2003; Guerra *et al.*, 2007; Goni-Urriza *et al.*, 2000). Nenhum dos isolados analisados, no presente estudo e que foram recuperados a partir dos diferentes pontos de amostragens em Portugal, apresentaram um fenótipo de resistência a este antimicrobiano. Uma das principais razões para esta observação pode dever-se ao facto de que em Portugal, o uso deste antibiótico não é permitido em produção animal. A resistência a este fármaco é observada em bactérias que produzem enzimas acetiltransferases, codificadas em plasmídeos e que catalisam a acetilação do grupo 3-hidroxi do cloranfenicol, desta forma o produto é incapaz de ligar-se à subunidade ribossomal 50S. No género *Aeromonas*, o fenótipo de resistência ao cloranfenicol tem sido associado à presença de genes codificantes para enzimas acetiltransferases identificados em elementos móveis de DNA (Henriques *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2007).

A percentagem da resistência observada para o trimetoprim-sulfametoxazol foi de 6% (7/111), esta frequência está de acordo com resultados apresentados por outros autores (Vila *et al.*, 2003; Goni-Urriza *et al.*, 2000; Aravena-romana *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2011). Cinco dos sete isolados que apresentaram um fenótipo de resistência ao trimetoprim-sulfametoxazol apresentaram simultaneamente resistência a outros antimicrobianos, incluindo o ácido nalidíxico e a norfloxacin.

A resistência a esta classe de antibióticos é mediada principalmente por sistema de transporte ativo, cujos genes são codificados em elementos móveis, ou por mutação cromossomais no gene que codifica para as enzimas alvos do antibiótico (Warren Levinson, 2010). No género *Aeromonas*, os genes determinantes da resistência trimetoprim-sulfametoxazol têm sido associados à presença de integrões. (Kadlec *et al.*, 2011).

As fluoroquinolonas têm sido classificadas como eficazes em tratamentos de infeções associadas ao género *Aeromonas* (Janda and Abbott, 2010), a eficácia desta classe de antimicrobianos tem sido demonstrada em estudos *in vivo* em pacientes infectados e *in vitro* com isolados clínicos (Parker and Shaw, 2011). No presente estudo, a frequência de resistência às fluoroquinolonas foram relativamente baixas para a norfloxacin - 4% (4/111) e ciprofloxacina - 1% (1/111) e nenhum dos isolados apresentou um fenótipo de resistência para a levofloxacina. No entanto as estirpes analisadas apresentam um elevado nível de resistência ao ácido nalidíxico (quinolonas). Cerca de 29% (32/111) dos isolados representantes apresentaram um fenótipo de resistência a este antimicrobiano. Em estudos anteriores, os níveis elevados de resistência às quinolonas, no género *Aeromonas*, foram atribuídos principalmente a mutações cromossomais pontuais como um resultado da seleção de estirpes resistentes 1após exposição excessiva a agente mutagénicos (Miyahara *et al.*, 2011 in Figueira *et al.*, 2011; Goñi-Urriza *et al.*, 2000). No entanto, diferentes variantes de plasmídeo que confere resistência às quinolonas mediada pelo gene *qnr* (codifica proteínas de proteção da DNA girase e topoisomerase IV) foram detetados em estirpes de diferentes espécies de *Aeromonas* isoladas de amostras ambientais (Picão *et al.*, 2008, Xia *et al.*, 2010 in Figueira *et al.*, 2011; Cattoir *et al.*, 2008; Goñi-Urriza *et al.*, 2000).

De acordo com o conceito de multirresistência adotado no presente estudo (Magiorakos *et al.*, 2011), uma estirpe é considerada multirresistente quando apresenta um fenótipo de resistência a pelo menos um antibiótico de três classes com alvos diferentes na célula bacteriana. Assim, no presente estudo, cerca de 11% (12/111) dos isolados analisados apresentaram um fenótipo multirresistente (MDR). O perfil de multirresistência de cada dos isolados é indicado na Tabela 11.

O aumento da frequência de fenótipos MDR em *Aeromonas* tem sido observado em isolados de origem clínica e ambientais (Goñi-Urriza *et al.*, 2000; Goñi-Urriza *et al.*, 2002; Girlich *et al.*, 2011). Alguns estudos descrevem que a ocorrência de fenótipos de multirresistência neste género bacteriano tem sido associada a bombas de efluxo (Hernould *et al.*, 2008; Seshadri *et al.*, 2006). No entanto, a resistência a múltiplos antibióticos em *Aeromonas* deve-se principalmente à presença de vários genes determinantes de resistência associados a elementos móveis de DNA (Bass *et al.*, 1999, Goldstein *et al.*, 2001 in Chang *et al.*, 2007; Libisch *et al.*, 2008; Henriques *et al.*, 2006) que contribuem para a disseminação de determinantes genéticos de resistência antimicrobiana por transferência horizontal de genes (Chang *et al.*, 2007).

**Tabela 11.** Fenótipo de multirresistência observados entre os isolados em estudo.

Isolados	Origem	Fenótipo de resistência
A3	Matadouro de suínos - PT	AMC - ETP - AK - TE
S5	Água residual (EPAL) - PT	AMC - TE - NA - CIP - NOR - STX
S8	Água residual (EPAL) - PT	AMC - TE - NA - NOR - STX
A219	Sedimento - TJ	NA - C - STX
A226	Sedimento - VN	AMC - AK - NA - STX
A174	Fezes de humanos - BD	NA - C - STX
A154	Fezes de humanos - BD	TE - NA - C - STX
A259	Clínica - PT	AMC - TE - NA
A143	Clínica - BE	CAZ - CN - TE - NA
A147	Clínica - BE	AMC - CN - TE - NA - NOR
A206	Clínica - BE	CTX - CAZ - CRO - ATM - TE - NA - C
A244	Clínica - BR	AMC - CTX - CAZ - CN - TE - NA - NOR

Legenda: AK – amicacina; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; ATM – aztreonam; C – cloranfenicol; CAZ – ceftazidima; CIP – ciprofloxacina; CN – gentamicina; CRO – ceftriaxona; CTX – cefotaxima; ETP – ertapenem; NA – ácido nalidíxico; NOR – norfloxacina; STX - trimetoprim/sulfametoxazol e TE – tetraciclina. Origens dos isolados: Bangladesh (BD); Bélgica (BE); Brasil (BR); Portugal (PT); Tailândia (TJ) e Vietnam (VN).

Numa análise global, observamos fenótipos de multirresistência entre isolados clínicos e ambientais. Teoricamente, era expectável uma maior prevalência de fenótipo de multirresistência em isolados clínicos dada a maior pressão seletiva, no entanto, sabe-se que o uso indevido e indiscriminado dos fármacos (Warren Levinson 2010) aumenta a probabilidade de seleção de estirpes resistentes noutros ambientes.

A frequência da resistência observada entre os isolados clínicos e ambientais não pode ser comparada por uma análise estatística devido ao fato da emergência de resistência aos diferentes antimicrobianos tentem a variar significativamente devido a pressões seletivas individuais condicionadas pela localização geográfica (tendo em conta a elevada variabilidade dos isolados em estudo, ex. diferentes origens, tipo de amostras e diferentes anos).

### 3.3.3 Potencial de patogenicidade dos isolados em estudo

Os isolados em estudo (N = 111) foram, numa fase inicial, submetidos a tipificação genómica para a seleção dos representantes. As relações de similaridade genómica entre os isolados da coleção foram observadas através da análise de dendrogramas construídos a partir dos perfis de RAPD-PCR dos isolados da coleção. Relativamente à relação genómica entre isolados ambientais e clínicos de *Aeromonas* spp., observa-se a ausência de uma distinção clara entre estes grupos, desta forma os dados obtidos sugerem uma inter-relação entre os isolados clínicos e ambientais. Adicionalmente, a ausência de formação de grupos específicos consoante a origem dos isolados e/ou tipo de amostra permite confirmar a elevada heterogeneidade deste género.

Os resultados dos testes fenotípicos em placa revelaram a elevada frequência de proteases, lipases e Dnases entre os isolados em estudo. Enquanto as proteases e lipases estão associadas a aquisição de compostos como fonte de carbono e azoto (Cascón *et al.*, 2000<sup>a</sup>), a função das DNases extracelulares é aparentemente mais ambígua. Além de estarem associadas à obtenção de nutrientes no ambiente as DNases extracelulares desempenham um papel importante nos mecanismos de defesa microbiana, proporcionando uma barreira à entrada de DNA estranho (Kamble and Deshmukh, 2012). Adicionalmente, é

possível que estas enzimas atuem na degradação do DNA de bactérias competidoras e desta forma confiram uma vantagem competitiva no meio ambiente. Desta forma, estas enzimas extracelulares contribuem para a versatilidade metabólica e favorecem as interações ecológicas, desta forma, contribuem a ampla disseminação e prevalência de membros de *Aeromonas* em diferentes nichos ecológicos. Apesar das evidências acerca da relevância destas enzimas como fatores de virulência serem reduzidas, em conjunto, estas enzimas podem exercer um efeito sinérgico, contribuindo para a degradação dos componentes da célula hospedeira, bem como dos componentes da matriz extracelular, e desta forma assumir um papel na invasão dos tecidos e disseminação no hospedeiro. Adicionalmente, a atividade DNAsica pode promover uma vantagem competitiva relativamente ao microbiota endógena e funcionar como um mecanismo de fuga às defesas do hospedeiro.

Relativamente à análise da ocorrência de genes de virulência, aproximadamente 93% (103/111) dos isolados tinham pelo menos um dos nove genes de virulência pesquisados. Diferentes combinações de genes de virulência foram observadas em isolados provenientes da mesma amostra. Estes dados sugerem que a distribuição de genes de virulência no género *Aeromonas* não é homogênea, e corrobora com outros estudos que investigaram a ocorrência de vários genes de virulência em que as diferentes combinações de potenciais fatores de virulência são identificadas em diferentes estirpes de uma mesma espécie (Albert *et al.*, 2000; Kingombe *et al.*, 2010; Sen and Rodgers, 2004; Wang *et al.*, 2003).

Para uma análise comparativa entre a prevalência de fatores de virulência entre isolados clínicos e ambientais, os dados foram tratados através de uma análise estatística de independência, pela realização do teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre isolados clínicos e ambientais para os genes *flaA/B*, *alt* e *ast*, para os restantes genes pesquisados foram observadas diferenças estatisticamente significativas. No entanto, as diferenças observadas não são conclusivas dado que podemos estar perante um efeito de “variável de confundimento”. Em estatística, uma variável de confundimento pode ser definida como uma variável externa, não tida em consideração no estudo e que se distribui de forma diferente entre as duas amostras, neste caso, isolados clínicos e não clínicos. A variável de confundimento pode promover associação onde esta não existe, ou pode mascarar a associação onde esta existe (Pestana and Velosa, 2008).

Devido as dificuldades de identificação ao nível de espécie neste género (apresentadas em 1.1.1. Identificação e classificação), a identificação dos isolados por uma abordagem MLST (*Multi-Locus sequence typing*) esta ainda a ser desenvolvida no nosso laboratório. Desta forma, os sessenta e quatro isolados de aeromonas que foram identificados ao nível de género no decorrer do presente trabalho não foram identificados ao nível de espécie, não sendo possível afirmar se existe uma distribuição diferencial das diferentes categorias (espécies) entre as diferentes amostras.

Uma compilação de dados de diferentes estudos sugere que existe uma variação nas frequências dos genes *ast*, *ascV*, *aexT*, *ahyB*, *act* e *hlyA* dependem da espécie. De acordo com estudos realizados por Khajanchi *et al.*, (2010), Martino *et al.*, (2011), Wu *et al.*, (2007), os genes *ascV* e *aexT* são maioritariamente identificado nas estirpes de *A. veronii* e ausente em *A. caviae*. Em estudos anteriores (Albert *et al.*, 2000; Kingombe *et al.*, 2010; Khajanchi *et al.*, 2010; Sen e Rodgers, 2004), a frequência dos genes *act* e *hlyA* tem sido relatada como inferior na espécie *A. caviae* quando comparada com a frequência observada em *A. hydrophila* e *A. veronii*. De acordo com os autores, Wu *et al.*, (2007), Kingombe *et al.*, (2010) e Sen e Rodgers (2004) o gene *ast* parece predominar na espécie *A. hydrophila*. Os resultados obtidos por Sen e Rodgers (2004) e Nagar *et al.*, (2011) indicam que o gene *ahyB* é raramente identificado na espécie *A.*

*veronii*. Desta forma, as diferenças nas prevalências destes genes entre os isolados clínicos e ambientais podem derivar de um efeito de variável de confundimento, associado a diferente distribuição das espécies nas duas amostras.

Embora a prevalência individual de alguns genes apresente padrões de desvio, as diferentes combinações de potenciais fatores de virulência identificados nas diferentes estirpes não parecem estar associadas a um tipo de ambiente específico. No presente estudo observámos que isolados de uma mesma amostra podem apresentar diferenças tanto no número como na combinação de genes de virulência que transportam.

Para uma análise integrada dos dados, foi construída uma tabela com dados binários (booleanos) obtidos a partir dos resultados da pesquisa dos genes de virulência, atividade enzimática, atividade hemolítica e dos perfis de suscetibilidade aos diferentes antimicrobianos. Esta tabela foi adicionada aos perfis de RAPD e seguidamente procedeu-se à construção de um dendrograma global para os isolados representantes da coleção. Os resultados estão representados no Anexo D.

Numa primeira análise, a observação dos diferentes perfis de virulência e de suscetibilidade permite confirmar a heterogeneidade genómica dos isolados em estudo. Verifica-se também a ausência de um conjunto de fatores de virulência predominante ou característico de ambientes específicos (ex. clínicos ou ambientais). Numa análise mais detalhada observou-se um nível de semelhança de 96% entre dois isolados clínicos provenientes de um hospital de Portugal. Estes isolados foram selecionados como representantes para avaliação do potencial de patogenicidade por terem sido recuperados de dois indivíduos distintos. Os respetivos isolados são provenientes do mesmo hospital porém não há informações adicionais acerca da relação de proximidade entre os indivíduos infetados nem do tipo de exposição que conduziu à transmissão do agente. O nível elevado de semelhança e a presença do mesmo perfil de virulência e de resistência sugerem que estes isolados estão estreitamente relacionados e portanto, supõe-se que há uma provável relação clonal entre estes isolados (Anexo D: Retângulo vermelho, Isolados A256 e A257). Para uma análise confirmatória, da relação clonal será necessário realizar a tipificação genómica através da técnica molecular *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), dado ser este o método *Gold-standard* para este tipo de análise.

Embora a relação clonal entre os isolados A256 e A257 ainda não esteja confirmada, parece não haver dúvidas que estes isolados foram de facto os responsáveis pela sintomatologia observada em dois indivíduos diferentes. O genótipo de virulência exibido pelos isolados A256 e A257 incluem a presença dos genes *ascV*; *aexT*; *act* e *flaA/B*. Porém, nenhum dos genes detetados nos isolados A256 e A257 foi observado em alguns isolados clínicos, que no entanto apresentam outros genes de virulência (ex. A147, A161, A232. Anexo D: Retângulo amarelo). Estas observações refletem a natureza multifatorial dos processos que levam ao desenvolvimento de doenças infecciosas associadas ao género. Diferentes estirpes transportam diferentes combinações de fatores de virulência que atuam em sinergismo contribuindo para o potencial patogénico associado ao género.

Os dados do presente estudo, relativamente à vasta gama de combinações de potenciais fatores de virulência associados à ampla disseminação destas bactérias no ambiente, apoiam a hipótese de que a incidência de gastroenterites relacionadas com este género pode estar a ser fortemente subestimada, principalmente porque grande parte dos laboratórios não preconiza a pesquisa de *Aeromonas* spp. em cultura de fezes, como referido por outros autores (Janda and Abbott, 2010), mas também devido à existência de estirpes menos virulentas que promovem o desenvolvimento de casos subclínicos.

Muitos autores têm tentado identificar fatores de virulência que poderiam ser os “fatores chave” no desenvolvimento da doença infecciosa e outros métodos de análise de diferenciação de fatores de virulência entre os membros deste género (Joseph and Carnahan, 2000; Khajanchi *et al.*, 2010; Martino *et al.*, 2011). É provável que outros fatores de virulência, que não foram pesquisados no presente estudo, tenham influência na gênese do processo infeccioso. Porém, dada a heterogeneidade observada, os nossos dados sugerem que não é possível atribuir a patogenicidade associada ao género *Aeromonas* a um fator único ou conjunto único de fatores de virulência, mas sim a vários parâmetros relacionados aos microrganismos (ex. fatores de virulência, dose infecciosa) e a suscetibilidade do hospedeiro. Isto explicaria as inconsistências relacionadas com a incapacidade de identificar um surto único de diarreia com uma relação clonal e a inexistência de um modelo animal que reproduza fielmente a síndrome diarreica associada ao género.

Relativamente aos perfis de suscetibilidade dos isolados em estudo, observamos uma elevada heterogeneidade de níveis de resistência entre os diferentes isolados. Esta variabilidade poderá ser condicionada por características específicas ambientais, como as pressões seletivas diferenciais em cada local de amostragem.

Entre os 19 isolados provenientes do matadouro de suínos, 15 exibiram um fenótipo de resistência *in vitro* ao antimicrobiano amoxicilina/ácido clavulânico. Considerando a frequência de 79% observada para este antimicrobiano, pode dizer-se que a resistência à amoxicilina/ácido clavulânico é uma característica partilhada pelas estirpes provenientes do matadouro. Outro dado que chama atenção entre os isolados provenientes do matadouro de suínos é o nível elevado de resistência ao ertapenem 26% (5/19) quando comparado à resistência total observada neste estudo 5% (6/111).

A resistência ao ertapenem entre os isolados do matadouro de suínos é preocupante visto que não se deverá à pressão seletiva através da utilização deste antimicrobiano, considerando que a utilização de agentes da subclasse dos carbapenémicos está restrita ao uso hospitalar (Livermore *et al.*, 2001).

Quanto à resistência a cefotaxime e ceftriaxone, foi observada unicamente no grupo de isolados provenientes do INSA, adicionalmente, três dos sete isolados resistentes ao aztreonam também foram recuperados do mesmo grupo. Alguns estudos (Koneman *et al.*, 2008) relatam uma associação entre a resistência às cefalosporinas de terceira geração e aztreonam com a atividade de  $\beta$ -lactamases de largo espectro (ESBLs), e portanto a resistência simultânea as cefalosporinas e ao aztreonam observada em três dos quatro isolados do grupo proveniente do INSA sugere a atividade ESBLs. Os elevados níveis de resistência bacteriana em ambientes onde há maior pressão seletiva é frequente e, associado a circulação das estirpes resistentes através das pessoas podem permitir a contaminação cruzada. Curiosamente, os isolados provenientes do INSA, embora com os perfis semelhantes de suscetibilidade, foram recuperados com um intervalo de alguns dias. Tendo em conta que os respetivos isolados foram recuperados de saladas prontas para o consumo e que estes alimentos são altamente manipulados, supõe-se que as condições insatisfatórias de higiene por parte do manipulador permitam a contaminação do alimento com estirpes resistentes que circulem nestes ambientes.

As resistências observadas, no presente estudo, para os  $\beta$ -lactâmicos parecem variar consoante as pressões seletivas específicas de cada ambiente. Apesar de outros mecanismos de resistência terem sido identificados, a produção de  $\beta$ -lactamases tem sido reconhecida como a principal causa de resistência a estes antimicrobianos em aeromonas. Os genes que codificam para estas enzimas foram localizados tanto no cromossoma de algumas estirpes como em elementos móveis de DNA (Girlich *et al.*, 2011; Libisch *et al.*, 2008; Neuwirth *et al.*, 2007). Desta forma, a pressão seletiva exercida especificamente em cada ambiente

pode ter favorecido a seleção de estirpes intrinsecamente resistentes e a posterior disseminação por propagação clonal, mas também pode estar a favorecer a disseminação de elementos móveis, o que faz com que este género atue como um veículo para a disseminação de determinantes de resistência.

É importante referir que os níveis de resistência a  $\beta$ -lactâmicos observados entre os isolados de *Aeromonas* em estudo podem ser inferiores aos níveis reais de resistência, dado que no género *Aeromonas* os mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos não são expressos de uma forma homogénea. Desta forma estirpes apresentam um fenótipo sensível *in vitro* podem comportar-se como resistentes *in vivo*, dificultando a deteção de resistência clinicamente relevante (Janda and Abbott, 2010; Koneman *et al.*, 2008). Estirpes produtoras de  $\beta$ -lactamases de largo espectro (ESBLs) podem ser clinicamente resistentes à terapia com penicilinas, cefalosporinas ou aztreonam, apesar da aparente suscetibilidade *in vitro* para alguns destes agentes. Da mesma forma, a identificação de estirpes de *Aeromonas* produtoras de metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs) é extremamente problemática. De acordo com o *Clinical Laboratory Standards Institute* as estirpes que apresentam zonas de inibição inferior à população normal suscetível, mas acima dos pontos de rutura padrão para determinadas cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima) ou aztreonam, devem ser selecionadas para confirmação da produção de ESBL (CLSI M100-S18, 2008).

De acordo com o critério definido para triagem de estirpes potencialmente produtoras de ESBLs, aproximadamente 16% (18/111) dos isolados submetidos ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos deverão ser analisados por testes adicionais (recomendações no CLSI M100-S18, 2008) para confirmação da produção de  $\beta$ -lactamases de largo espectro. Os resultados obtidos para a resistência ao ertapenem e a elevada percentagem de fenótipos intermédios para o ertapenem em 9% (10/111) e imipenem 15% (17/111) nos isolados pode ser um indicativo da produção de MBLs.

Entre os isolados provenientes de águas não tratadas da EPAL cerca de 62% (8/13) exibiram um perfil de resistência ao ácido nalidíxico. Deste grupo de isolados também foram identificados fenótipos de resistência à norfloxacin e ciprofloxacina. Os isolados resistentes a norfloxacin apresentaram, em simultâneo, resistência ao ácido nalidíxico, e um destes isolados, além da resistência a estes dois antimicrobianos exibiu adicionalmente resistência a ciprofloxacina. Embora, o principal mecanismo de resistência às quinolonas, no género *Aeromonas* seja atribuído a mutações cromossomais pontuais, é provável que o mecanismo que esteja na base da resistência observada esteja a mediar também a resistência à norfloxacin e ciprofloxacina. Adicionalmente, os isolados que exibiram fenótipos de resistência às quinolonas/fluoroquinolonas exibiram também resistência à tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol e amoxicilina/ácido clavulânico. De facto, geralmente, isolados recuperados de ambientes poluídos estão sujeitos a uma maior pressão seletiva, desta forma apresentam resistências a diferentes agentes antimicrobianos (Goñi-Urriza *et al.*, 2000).

Apesar dos fenótipos de resistência observados serem preocupantes, os dados podem ser ainda mais relevantes se as estirpes resistentes possuírem capacidade de infetar o hospedeiro. Tendo em conta estas considerações, e associando os perfis de virulência aos perfis de suscetibilidade, verificámos a presença de estirpes potencialmente patogénicas nos diferentes ambientes de processamento e distribuição de alimentos.

Com a integração de todos os resultados obtidos, verificámos a presença de estirpes potencialmente patogénicas entre os isolados provenientes da fábrica de queijos. Apesar do potencial perigo associado à presença de aeromonas neste ambiente, dado que os produtos finais estarem prontos para o consumo, a

suscetibilidade observada a todos os antimicrobianos (excepto amoxicilina/ac. clavulânico) reduz o risco associado.

Quanto aos isolados provenientes do hipermercado (talho e peixaria) e matadouro de suínos, verificamos a presença de estirpes potencialmente patogénicas, tendo sido detetados uma ampla variedade de combinações de potenciais fatores de virulência. Adicionalmente foram detetados fenótipos de resistência a antibióticos clinicamente importantes (ex. A3, A13, A23, A37, A57. Anexo D: retângulo azul). Apesar do potencial perigo associado a estes isolados, os alimentos procedentes dos respetivos ambientes, normalmente, passam por tratamentos térmicos antes de serem consumidos, e portanto reduz o perigo associado.

Relativamente aos isolados provenientes do INSA e que foram recuperados de saladas prontas para o consumo, apesar do fenótipo de resistência observado ser altamente preocupante, visto ser sugestivo da presença de estirpes produtoras de  $\beta$ -lactamases de largo espectro, apenas no isolado A123 (Anexo D: retângulo azul) foram detetados os potenciais fatores de virulência pesquisados. Contudo é importante referir que outros fatores de virulência, que não foram pesquisados neste estudo, podem contribuir para o potencial patogénico de aeromonas.

## 4 CONCLUSÕES

No presente estudo, analisámos a disseminação de *Aeromonas* spp. numa fábrica de queijos, num matadouro de suínos e num hipermercado. Posteriormente, a avaliação do potencial de patogenicidade dos isolados foi realizada através da pesquisa de fatores de virulência e perfis de resistência aos antimicrobianos.

Na globalidade dos resultados verificámos que *Aeromonas* spp. estão amplamente disseminada nos diferentes locais de amostragem. Verificámos a presença de estirpes potencialmente patogénicas, transportando diferentes conjuntos de determinantes genéticos codificantes para enterotoxinas, hemolisinas e fatores relacionados com a adesão e invasão dos tecidos e disseminação no hospedeiro. Verificámos a elevada expressão de enzimas extracelulares que apesar de não estarem associadas diretamente com a patogenicidade, interagem de forma complexa contribuindo para o desenvolvimento e estabelecimento do processo infeccioso. Adicionalmente, verificámos a presença de fenótipos de resistência a diferentes antibióticos que poderão contribuir para falhas terapêuticas, conduzindo à persistência do agente no organismo do hospedeiro, o que poderá constituir uma ameaça à saúde pública. Estas considerações são ainda mais relevantes dada a presença de resistência a antimicrobianos clinicamente importantes como as cefalosporinas de terceira geração e carbapenémicos.

Associando os perfis de virulência aos perfis de resistência aos antimicrobianos, verificamos que as estirpes com maior potencial de patogenicidade são provenientes de ambientes onde os alimentos serão processados por tratamentos térmicos antes de serem consumidos, e esta prática reduz significativamente a carga microbiana no alimento e portanto reduz o potencial perigo associado à presença de aeromonas. Contudo, a elevada disseminação destas bactérias potencializa a probabilidade da ocorrência de contaminações cruzadas e portanto, reforça a necessidade de ótimas práticas de higiene, processamento e conservação dos alimentos, com o objetivo de controlar a transmissão, não só de aeromonas como também de outros agentes infecciosos transmitidos via alimentar.

Em conclusão, a presença de estirpes de aeromonas potencialmente patogénicas disseminadas em pontos de processamento e distribuição de alimentos promovem a contínua exposição ao agente, constituindo um potencial perigo, principalmente aos indivíduos mais susceptíveis, como crianças, idosos e imunocomprometidos onde a infeção via alimentar pode evoluir para infeções invasivas. Portanto, é importante avaliar a incidência de infeções associadas às aeromonas para melhor avaliar o real impacto que estes microrganismos exercem na população.

No término da presente investigação algumas questões ficaram em aberto e deverão ser analisadas em trabalhos futuros:

Os resultados do presente estudo sugerem que estirpes resistentes são resultantes, essencialmente, da pressão seletiva dos vários ambientes. Portanto, os resultados apontam, principalmente, para a existência de elementos móveis de DNA na base dos fenótipos de resistência observados. Desta forma os dados fenotípicos necessitam de ser complementados com a pesquisa dos respetivos determinantes da resistência, dado que a presença de genes de resistência localizados em elementos móveis aumenta o risco associado à presença de aeromonas no ambiente.

Embora a pesquisa dos potenciais fatores de virulência, preconizados no presente trabalho, seja necessária e contribua para estudos de virulência associada ao género, é insuficiente, sendo necessário completá-la com uma análise de expressão génica e ensaios de citotoxicidade em células animais.

Outra questão que pode ser analisada é a incidência de aeromonas nos mesmos ambientes de processamento e distribuição de alimentos, focando principalmente alimentos prontos para o consumo. Muitos trabalhos têm sugerido a existência sazonal na recuperação de aeromonas no ambiente e também de amostras clínicas, com maior incidência nos meses de verão. Desta forma, é importante analisar a incidência nestes ambientes nos meses mais quentes, dado que os isolados do presente estudo foram maioritariamente recuperados entre os meses de Outubro e Novembro.

## 5 REFERÊNCIAS

- Abbott S.L., Cheung W.K. and Janda J.M. (2003). The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (6): 2348.
- Albert M.J., Ansaruzzaman K.A., Talukder A.K., Chopra I., Kuhn M., Rahman A.S., Faruque M.S., Islam R.B., Sack and Molby R., (2000). Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 3785 - 3790.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P., (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science . 4th edition.
- Angel M. F., Zhang F., Jones M., J. Henderson J. and Chapman S. W. (2002). Necrotizing fasciitis of the upper extremity resulting from a water moccasin bite. *Southern Medical Journal*. 95: 1090 - 1094.
- Aravena-Román M., Beaz-Hidalgo R., Inglis T.J.J., Riley T.V, Martínez-Murcia A.J., Chang B.J. and Figueras M.J., (2012). *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water in Western Australia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*.
- Avison M.B., Niumsup, P., Walsh, T.R., Bennett, P.M. 2000. *Aeromonas hydrophila* AmpH and CepH beta-lactamases: derepressed expression in mutants of *Escherichia coli* lacking *creB*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46 (5): 695-702.
- Balassiano I.T., Bastos M.C., Madureira D.J., Silva I.G., Freitas-Almeida A.C. and Oliveira S.S., (2007). The involvement of *tetA* and *tetE* tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. Instituto Oswaldo Cruz. 102 (7): 861 - 66.
- Beaz-Hidalgo R., Alperi A., Buján N., Romalde J.L. and Figueras M.J., (2010). Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology*. 33 (3): 149 - 153.
- Biscardi D., Castaldo A., Gualillo O. and Fusco R., (2002). The occurrence of cytotoxic *Aeromonas hydrophila* strains in Italian mineral and thermal waters. *Science of the Total Environment*. 292 (3): 255 - 263.
- Bomo A.M., Storey M.V. and Ashbolt N.J., (2004). Detection, integration and persistence of aeromonads in water distribution pipe biofilms. *Journal Water Health*. 2 (2): 83 - 96.
- Brenden R. and J.M. Janda. (1987). Detection, quantitation and stability of the beta haemolysin of *Aeromonas* spp. *Jornal of Medical Microbiology*. 24: 247 - 251.
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A., (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 303 (5663): 1532 - 1535.
- Burr S.E., Stuber K. and Frey J., (2003). The ADP-Ribosylating Toxin, AexT, from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* Is Translocated via a Type III Secretion Pathway. *Journal Of Bacteriology*. 185 (22): 6583 - 6591.
- Bush K. and Jacoby G.A. (2010). Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54 (3): 969 - 976.
- Cascón A., Fregeneda J., Aller M., Yugueros J., Temprano A., Sánchez M. Rodríguez-Aparicio L., Naharro G. and Hernanz C., (2000b). Cloning, characterization, and insertional inactivation of a major extracellular serine protease gene with elastolytic activity from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*. 23 (1): 49 - 59.
- Cascón A., Yugueros J., Temprano A., Sánchez M., Hernanz C., Luengo J.M. and Naharro G., (2000a). A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*. 68 (6): 3222 - 3241.
- Cattoir V., Poirel L., Aubert C., Soussy C., and Nordmann P., (2008). Unexpected Occurrence of Resistance Determinants. 14(2): 231 - 237.
- Chacón M.R., Castro-Escarpulli G., Soler L., Guarro J., Figueras M.J., (2002). A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 44 (3): 221 - 225.
- Chacón M.R., Figueras M.J., Castro-Escarpulli G., Soler L. and Guarro J., (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental strains of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*. 84 (4): 269 - 278.
- Chacón M.R., Soler L., Groisman E.A. and Guarro J., (2004). Type III Secretion System Genes in Clinical *Aeromonas* Isolates Type III Secretion System Genes in Clinical *Aeromonas* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (3): 1285.
- Chang Y.C., Shih D.Y.C., Wang J.Y. and Yang S.S., (2007). Molecular characterization of class 1 integrons and antimicrobial resistance in *Aeromonas* strains from foodborne outbreak-suspect samples and environmental sources in Taiwan. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 59(2): 191 - 197.
- Chauret C., Volk C., Creason R., Jarosh J., Robinson J. and Warnes C., (2001). Detection of *Aeromonas hydrophila* in a drinking-water distribution system: a field and pilot study. *Canadian Journal of Microbiology*. 47 (8): 782-786.
- Chopra A.K. and Houston C.W., (1999). Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes and Infection*. 1: 1129 - 1137.
- Chuang Y.C., Chiou S.F., SU J.H., Wu M.L. and Chang M.C., (1997). Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. *Microbiology*. 143: 803 - 812.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Approved Standard M100-S17 AND Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria: Proposed Guideline M45-A. CLSI, Wayne, PA, USA, 2006.
- Daskalov H. (2006). The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control* 17(6): 474 - 483.
- Demarta A., Tonolla M., Caminada A., Beretta M. and Peduzzi R., (2000). Epidemiological relationships between *Aeromonas* strains isolated from symptomatic children and household environments as determined by ribotyping. *European Journal of Epidemiology*. 16 (5): 447-53.
- Dias C., Mota V., and Murcia A. M., (2012). Antimicrobial Resistance Patterns of *Aeromonas* spp. Isolated from Ornamental Fish. *Journal of Aquaculture Research & Development*. 03(03).
- Donlan R.M. and Costerton J.W., (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 15 (2): 167 - 193.
- Ecker DJ, Sampath R, Willett P, Wyatt JR, Samant V, Massire C, Hall TA, Hari K, McNeil JA, Büchen-Osmond C, Budowle B., (2005). The Microbial Rosetta Stone Database: a compilation of global and emerging infectious microorganisms and bioterrorist threat agents. *BMC Microbiology*. 5: 19.
- Edberg S.C., Browne F.A., and Allen M.J., (2007). Issues for microbial regulation: *Aeromonas* as a model. *Critical Reviews in Microbiology*. 33 (1): 89 - 100.
- Emekdas G., Aslan G., Tezcan S., Serin M.S., Yildiz C., Ozturhan H. and Durmaz R., (2006). Detection of the frequency, antimicrobial susceptibility, and genotypic discrimination of *Aeromonas* strains isolated from municipally treated tap water samples by cultivation and AP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 107 (3): 310 – 314.
- Farmer III J.J., Arduino M.J. and Hickman-Brenner F.W., (2006). The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: Dworkin, Falkow, Rosenberg, Schleifer and Stackebrandt, editors. *The Prokaryotes*, Vol.6, A handbook on the Biology of Bacteria, 3<sup>o</sup> ed. Springer. 564 - 596.
- Figueira V., Vaz-Moreira I., Silva M. and Manaia C.M., (2011). Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. *Water Research*. 45 (17): 5599 - 5611.
- Figueras M.J., Soler L., Chacón M.R., Guarro J. and Martínez-Murcia A.J., (2000). Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50 (6): 2069-73.
- Fosse T., Giraud-Morin C. and Madinier I., (2004). *Aeromonas hydrophila* with Plasmid-Borne Class A Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase TEM-24 and Three Chromosomal Class B, C, and D  $\beta$ -Lactamases, Isolated from a Patient with Necrotizing Fasciitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48 (6): 2342-2343.
- Girlich D., Poirel L. and Nordmann P., (2011). Diversity of Clavulanic Acid-Inhibited Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Aeromonas* spp. from the Seine River, Paris, France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55 (3): 1256-1261.
- Goñi-Urriza M., Arpin C., Capdepuy M., Dubois V., Caumette P., Quentin C., (2002). Type II topoisomerase quinolone resistance-determining regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, and *A. sobria* complexes and mutations associated with quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46: 350 - 359.
- Goñi-Urriza M., Pineau L., Capdepuy M., Roques C., Caumette P. and Quentin C., (2000). Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46 (2): 297 - 301.
- Graevenitz A. V., (2007). The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. *Infection*. 35 (2): 59 - 64.
- Guerra I.M.F., Fadanelli R., Figueiró M., Schreiner F., Delamare A.P.L., Wollheim C., Costa S.O.P., (2007). *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38(4): 638 - 643.
- Henriques I.S., Fonseca F., Alves A., Saavedra M.J. and Correia A. (2008). Tetracycline resistance genes in Gram-negative isolates from estuarine waters. *Letters in Applied Microbiology*. 47 (6): 526 - 33.
- Henriques I.S., Fonseca F., Alves A., Saavedra M.J. and Correia A., (2006). Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Research in Microbiology*. 157 (10): 938 – 947
- Hernould M., Gagné S., Fournier M., Quentin C. and Arpin C., (2008). Role of the AheABC efflux pump in *Aeromonas hydrophila* intrinsic multidrug resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 52 (4): 1559 - 1563.
- Huddleston J.R., Zak J.C. and Jeter R.M., (2006). Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* spp. isolated from environmental sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (11): 7036 - 7042.
- Igbinosa IH., Igumbor U.E., Aghdasi F., Tom M. and Okoh AI., (2012). Emerging *Aeromonas* Species Infections and Their Significance in Public Health. *The Scientific World Journal*. 625023.
- Jacoby G.A., (2009). AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 22 (1): 161 - 82.
- James M.J., (2005). *Microbiologia de Alimentos*. 6<sup>o</sup> ed. Artmed.
- Janda J. M., and Abbott S. L., (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 2761 - 2764.
- Janda J.M. and Abbott S.L., (1998). Evolving Concepts Regarding the Genus *Aeromonas*: An Expanding Panoplia of Species, Disease Presentations, and Unanswered Questions. *Clinical Infectious Diseases*. 27: 332 - 334.

- Janda J.M. and Abbott S.L., (2010). The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 23 (1): 35 - 73.
- Janda, J. M., and P. S. Duffey., (1988). Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. *Reviews of Infectious Diseases*. 10: 980 - 997.
- Joseph S.W. and Carnahan, A.M., (2000). Update on the genus *Aeromonas*. *ASM News*, Philadelphia. 66: 218 - 223.
- Kadlec K., von Czapiewski E., Kaspar H., Wallmann J., Michael G. B., Steinacker U. and Schwarz S., (2011). Molecular basis of sulfonamide and trimethoprim resistance in fish-pathogenic *Aeromonas* isolates. *Applied and environmental microbiology*. 77(20): 7147 - 7150.
- Kamble K.D. and Deshmukh S.M., (2004). Influence of Metals on Activity of Extracellular Deoxyribonuclease Produced by *Aeromonas* species. *International Journal of Research in Chemistry and Environment*. 2 (4): 29 -33.
- Khajanchi B.K., Fadl A.A, Borchardt M.A., Richard L. Berg R.L., Amy J. Horneman A.J., Stemper M.E., Joseph S.W., Moyer N.P., Sha J., and Chopra A.K., (2010). Distribution of Virulence Factors and Molecular RAPD of *Aeromonas* Species Isolates from Water and Clinical Samples: Suggestive Evidence of Water-to-Human Transmission. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (7): 2313 - 2325.
- Kingombe B., D'Aoust J.Y., Huys C.I., Hofmann L., Rao M. and Kwan J., (2010). Multiplex PCR method for detection of three *Aeromonas* enterotoxin genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (2): 425 - 433.
- Kingombe B., Huys C.I., Tonolla M., Albert M.J., Swings J., Peduzzi R., and Jemmi T., (1999). PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (12): 5293 - 5302.
- Kirov S.M., Castrisios M. and Sha J.G., (2004). *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesions that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infection and Immunity*. 72: 1939 - 1945.
- Ko W.C., Wu H.M., Chang T.C., Yan J.J. and Wu J.J., (1998). Inducible  $\beta$ -Lactam Resistance in *Aeromonas hydrophila* Therapeutic Challenge for Antimicrobial Therapy. *Journal of Clinical Microbiology*. 36 (11): 3188 -3192.
- Kohanski M., Dwyer D. J. and Collins J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature reviews. Microbiology*. 8 (6): 423 - 35.
- Koneman E.W., Stephen D.A. and William M.J., (2008). Diagnóstico microbiológico - texto e atlas colorido, 6ª edição. Ed. Guanabara. Capítulo 8 parte II e capítulo 17.
- Krzyminska S., Mokracka J., Koczura R., Cwiertnia A. and Kaznowski A., (2012). *Aeromonas* spp. mediated cell-contact cytotoxicity is associated with the presence of type III secretion system. *Antonie van Leeuwenhoek*. 101 (2): 243 - 251.
- Kuang Z., Hao Y., Walling B.E., Jeffries J.L., Ohman D.E. and Gee W., (2011). *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Provides an Escape from Phagocytosis by Degrading the Pulmonary Surfactant Protein-A. *PLoS ONE*. 6 (11): 27091.
- Lamy B., Kodjo A. and Laurent F., (2009). Prospective nationwide study of *Aeromonas* infections in France. *Journal of Clinical Microbiology*. 47 (4): 1234 -1237.
- Libisch B., Giske C.G., Kovacs B., Toth T.G, and Fuzi M., (2008). Identification of the first VIM metallo- $\beta$ -lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain. *Journal of Clinical Microbiology*. 46 : 1878 - 1880.
- Livermore D.M., Carter M.W., Bagel S., Wiedemann B., Baquero F., Loza E., Endtz H.P., *et al.*, (2001). In Vitro Activities of Ertapenem (MK-0826) against Recent Clinical Bacteria Collected in Europe and Australia. 45 (6): 1860 - 1867.
- Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L., (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 18 (3): 268 - 281.
- Marques, C. (2011). Identificação molecular de cepas de *Aeromonas* spp. isoladas durante um surto de diarreia em São Bento do Una, PE. Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz.
- Martin-Carnahan A. and Joseph S.W. 2005. Family I. Aeromonadaceae Colwell, MacDonell and De Ley 1986, 474VP. In: Brenner, Krieg, Staley and Garrity, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria. 2nd ed. New York: Springer.
- Martinez-Murcia A. J., Monera A., Saavedra M. J., Oncina R., Lopez-Alvarez M., Lara E. and Figueras M. J., (2011). Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Systematic and applied microbiology*. 34(3): 189 - 199.
- Martínez-Murcia A., Beaz-Hidalgo R., Svec P., Saavedra M.J., Figueras M.J. and Sedlacek I., (2012). *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. *Current microbiology*.
- Martínez-Murcia A.J., Benlloch S., Collins M.D. (1992). Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Pleisiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: Lack of Congruence with result of DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 42 (3): 412 - 421.
- Martino M.E., Fasolato L., Montemurro F., Rosteghin M., A Manfrin., Patarnello T., Novelli E., Cardazzo B. (2011). 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*. 77 (14): 4986 - 5000.

- Merino A.A., Noguera M.M., Regue M., Swift S. and Tomas J.M., (1999). Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infection and Immunity*. 67: 4008 - 4013.
- Merino S., Shaw J.G. and Tomás J.M., (2006). Bacterial lateral flagella an inducible flagella system. *FEMS Microbiology Letters*. 263 (2): 127 - 135.
- Mohamed O.E. and Robert V., (1999). Miller Study of the Response of a Biofilm Bacterial Community to UV Radiation. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (5): 2025 - 2031.
- Morandi A., Zhaxybayeva O., Gogarten J.P. and Graf P., (2005). Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. *Journal of bacteriology*. 187: 6561 - 6564.
- Murray R.P., Rosenthal K.S. and Pfaller M.A. (2009). 6<sup>o</sup> Edition. MDMedical Microbiology.
- Nagar V., Shashidhar R. and Bandekar J. R., (2011). Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Aeromonas* strains from various retail food products in Mumbai, India. *Journal of food science*. 76 (7): 486 - 492.
- Naharro G., Rubio P., Luengo M.J., (2011). Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens. Chapter 68. *Aeromonas*.
- Neuwirth C., Siebor E., Robin F., and Bonnet R., (2007). First occurrence of an IMP metallo- $\beta$ -lactamase in *Aeromonas caviae*; IMP-19 in an isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51: 4486 - 4488.
- Neyts K., Huys G., Uyttendaele M., Swings J. and Debevere J., (2000). Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. *Letters in Applied Microbiology*. 31 (5): 359 - 363.
- Oliveira M., Sales-Luís T., Semedo-Lemsaddek T., Ribeiro T., Pedrosa N.M., Tavares L. and Vilela C.L., (2011). Antimicrobial resistance *Aeromonas* isolated from Eurasian otters (*Lutra lutra Linnaeus*, 1758) in Portugal in "Perspectives in Animal Ecology and Reproduction".
- Pablos M., Huys G., Cnockaert M., Rodríguez-Calleja J.M., Otero A., Santos J.A. and García-López M.L., (2011). Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. *International Journal of Food Microbiology*. 147 (3): 203 - 210.
- Palu A.P., Gomes L.M., Miguela M.A.L., Balassiano I.T., Queiroz M.L.P., Almeida A.C.F. and Oliveira S.S., (2006). Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. *Food Microbiology*. 23: 504 - 509.
- Parker J.L. and Shaw J.G., (2011). *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *Journal of Infection*. 62 (2): 109 - 118.
- Pemberton J.M., Kidd S.P. and Schmidt, R., (1997). Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*. 152: 1 - 10.
- Pestana D.D. and Velosa S. (2008). "Introdução à Probabilidade e à Estatística", 3<sup>a</sup> ed., Calouste Gulbenkian Edition.
- Pitcher D.G., Saunders N.A., and Owen R.J., (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters Applied Microbiology*. 8:151 - 156.
- Poole K., (2004). Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61 (17): 2200 - 2223.
- Rabaan A.A., Gryllos I., Tomás J.M. and Shaw J.G., (2001). Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells. *Infection and Immunity*. 69 (7): 4257 - 4267.
- Saavedra M.J., Figueras M.J., Martínez-Murcia A.J., (2006). Update phylogeny of the genus *Aeromonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 2481 - 2487.
- Saavedra M.J., Novais S., Alves A., Rema P., Tacão M., Correia A. and Martínez-Murcia A., (2004). Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Microbiology*. 7: 207 - 211.
- Schubert R.H.W., (1967). The taxonomy and nomenclature of the genus *Aeromonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 17 (1): 23 - 37.
- Scoaris D.O., Colacit J., Nakamura C.V. Ueda-Nakamura T., Abreu, B.A. and Dias B.P., (2008). Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. Isolated from drinking water. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 93 (1-2): 111 - 122.
- Sen K and Lye D., (2007). Importance of flagella and enterotoxins for *Aeromonas* virulence in a mouse model. *Canadian Journal of Microbiology*. 53 (2): 261 - 269.
- Sen K. and Rodgers M., (2004). Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *Journal of Applied Microbiology*. 97 (5): 1077 - 1086.
- Seshadri R., Joseph S.W., Chopra A.K., Sha J., Shaw J., Graf j., Haft D., Wu M., Ren Q., Rosovitz M.J., Madupu R., Tallon L., Kim M., Jin S., Vuong H., Stine O.C., Ali A., Horneman A.J. and Heidelberg J.F., (2006). Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. 188 (23): 8272 - 8282.
- Sha J., Kozlova E.V. and Chopra K., (2002). Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila* induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxin activity. *Infection and Immunity*. 70: 1924 - 1935.
- Sha J., Pillai L., Fadl A.A., Galindo C.L., Erova T.E. and Chopra A.K., (2005). The type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alter the virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*. 73 (10): 6446 -6457.
- Sha J., Wang S.F. Suarez G., Serra J.C., Fadl A.A., Erova T.E., Foltz S.M., Khajanchi B.K., Prata A., Graf J., Schein C.H. and Chopra A.K., (2007). Further characterization of a type III secretion system (T3SS) and of a new effector protein from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*-part I. *microbial pathogenesis*. 43 (4): 127 - 146.

- Sierra J.C., Suarez G., Sha J., Foltz S.M., Popov V.L., Galindo C.L., Garner H.R. and Chopra A.K., (2007). Biological characterization of a new type III secretion system effector from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*-part II. *Microbial Pathogenesis*. 43 (4): 147-60.
- Sinha S., Shimada T., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Yamasaki S., Takeda Y., Balakrish G., (2004). Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. *Journal of Medical Microbiology*. 53: 527- 534.
- Soler L., Figueras M.J., Chacón M.R., Vila J., Marco F., Marínez-Murcia A.J. and Guarro J., (2002). Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 32 (3): 243-247.
- Soler L., Marco F., Vila J., Chacón M.R., Guarro J. and Figueras M.J., (2003). Evaluation of Two Miniaturized Systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for Identification of Clinical Isolates of *Aeromonas* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (2): 5732 - 5734.
- Soler L., Yáñez M.A., Chacon M.R., Aguilera-Arreola M.G., Catalán V., Figueras M.J., Martínez-Murcia A.J., (2004). Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54 (5): 1511 - 1519.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A., Kämpfer P., Donzela M.C., Nesme X., Rosselló-Mora R., Swings J., Truper H.G, Vauterin L., Ward A.C and Whitman W.B., (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 1045 - 1047.
- Stuber K., Frey J., Burnens A.P. and Kuhnert, P. 2003. Detection of type III secretion gene as a general indicator of bacterial virulence. *Molecular and Cellular Probes*. 17 (1): 25 - 32.
- Sturenburg E. and Mack D., (2003). Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *Journal of Infection*. 47(4): 273 - 295.
- Szczuka E. and Kaznowski A., (2004). 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*. 42 (1): 220 - 228.
- Tacão M., Alves A., Saavedra, M.J., Correia A., (2005). BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp.. *Antonie van Leeuwenhoek*. 88 (2): 173 - 179.
- Tsai M.S., Kuo C.Y., Wang M.C., Wu H.C., Chien C.C. and Liu J.W., (2006). Clinical features and risk factors for mortality in *Aeromonas* bacteremic adults with hematologic malignancies. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 39 (2): 150 - 154.
- Valério E., Chaves S. and Tenreiro R., (2010). Diversity and Impact of Prokaryotic Toxins on Aquatic Environments: A Review. *Toxins*. 2 (10): 2359 - 2410.
- Vila J., Ruiz J., Gallardo J., Vargas M., Soler L., Figueras M.J. and Gascón J., (2003). *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Diseases*. 9: 552 - 555.
- Walsh T.R., Stunt R.A., Nabi J.A., MacGowan A.P. and Bennett P.M., (1997). Distribution and expression of  $\beta$ -lactamase genes among *Aeromonas* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 40 (2): 171 - 178.
- Wang E., Warren D.K, Ferris V.M., Casabar E. and Nussenbaum B., (2011). Leech-Transmitted Ciprofloxacin-Resistant *Aeromonas hydrophila*. *Archives of Otolaryngology Head & Neck Surgery*. 137 (2): 190 - 193.
- Wang G., Clark C.G., Liu C., Pucknell C., Munro C.K., Kruk T.M., Caldeira R., Woodward D.L., Rodgers F.G., (2003). Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(3): 1048 - 1054.
- Warren Levinson (2010). *Medical Microbiology and Immunology*. 10th Edition. Mc Graw-Hill.
- Wu C.J., Chuang Y.C., Lee M.F., Lee C.C., Lee H.C., Lee N.Y., Chang C.M., Chen P.L., Lin Y.T., Yan J.J. and Ko W.C., (2011). Bacteremia Due to Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Aeromonas* spp. at a Medical Center in Southern Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55 (12): 5813 - 5818.
- Wu C.J., Wu J.J., Yan J.J., Lee H.C., Lee N.Y., Chang C.M., Shih H.I., Wu H.M., Wang L.R., Ko W.C. (2007). Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan. *Journal of Infection*. 54 (2): 151 - 158.
- Yu H.B., Zhang Y.L., Lau Y.L., Yao F., Vilches S., Merino S., Tomas J.M., Howard S.P. and Leung K.Y. (2005). Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD/134/91. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (8): 4469 - 4477.
- Zacaria J., Delamare A.P.L., Costa S.O.P. and Echeverrigaray S., (2010). Diversity of extracellular proteases among *Aeromonas* determined by zymogram analysis. 109: 212 - 219.

Anexo A - Descrição das amostras e os respetivos locais de amostragem.

Tabela 1 - Amostras alimentares recolhidas nos diferentes locais de amostragem.

Locais de amostragem	Amostras alimentares analisadas	
Fábrica de queijos	Queijo de cabra curado	✓
	Queijo de vaca curado	✓
	Queijo de ovelha curado	✓
	Queijo fresco de ovelha	✓
	Leite pasteurizado	✓
	Leite cru	✓
	Soro de leite	✓
	Salmoura	✓
Hipermercado	Carapau fresco	✓+
	Carne fresca	✓+
	Sandes	✓
	Lombo assado	✓

Legendas: (✓) amostra analisada; (✓ +) amostra analisada e positiva para a presença de *Aeromonas*.

Tabela 2 - Amostras de águas recolhidas nos diferentes locais de amostragem.

Locais de amostragem	Amostras analisadas	
Fábrica de queijos	Água não tratada	✓+
	Água tratada*	✓+
Hipermercado	Água utilizada para lavagem de carnes e peixes	✓
	Água utilizada na lava loiça	✓

Legendas: (✓) amostra analisada; (✓ +) amostra analisada e positiva para a presença de *Aeromonas*. \* amostra positiva após o enriquecimento em água peptonada tamponada (30 °C/24 h).

Tabela 3 - Amostras de superfícies recolhidas na Fábrica de queijos.

Superfícies de recolhas	Zonas de processamento dos queijos	
	Preparação	Maturação
Carrinhos de transporte	✓	✓
Puxadores de portas	✓	-
Pá de corte do coágulo	✓	-
Luvras dos trabalhadores	✓	✓
Avental dos trabalhadores	✓+	✓+*
Recipiente para o colorau	-	✓
Ralo	✓+	✓+
Moldes para os queijos	✓	-
Cuba de corte do leite coagulado	✓	-

Legendas: (✓) amostra analisada; (✓ +) amostra analisada e positiva para a presença de *Aeromonas*; (-) amostra não analisada. \* amostra positiva após o enriquecimento em água peptonada tamponada (30 °C/24 h). Zona de maturação – secções onde o queijo é armazenado até adquirir as características organolépticas.

Tabela 4 - Amostras de superfícies recolhidas no Matadouro de suínos.

Superfícies de recolhas	Zona de corte da carne	Zona da refrigeração	Zona da salsicharia
Depósito de tripa para enchidos	-	-	v+
Caixas de transporte	v+	v+	-
Avental de trabalhadores	v+	-	-
Luva de trabalhadores	v	-	-
Maçaneta de portas	v	-	-
Faca	v	-	v
Bancada com manipulação	v	-	v
Chão	v	v+	v+
Carcaça – cabeça	v	-	-
Carcaça – coxa	v+	-	-
Carcaça – rejeitada	v+	-	-
Ralo	v+	v	v+
Ganho	v	-	-

Legendas: (v) amostra analisada; (v +) amostra analisada e positiva para a presença de *Aeromonas*; (-) amostra não analisada.

Tabela 5 - Amostras de superfícies recolhidas no hipermercado.

Superfícies de recolhas	Zonas de amostragens				
	Talho	Peixaria	Charcutaria	Gastronomia	
Recolhas antes da higienização	Luvas dos trabalhadores	v+	v+	v	v
	Avental dos trabalhadores	v+	v	v	-
	Faca/tesoura de corte	v+	v	-	v
	Bancada/tabuleiro	v+	v+	-	v+
	Ralo	v+	v	-	-
	Ralo lava Loiça	v+	v+	-	v
	Fatiadora - Queijo	-	-	v	-
	Fatiadora - Fiambre	-	-	v	-
	Fatiadora - Leitão	-	-	-	v
Recolhas após higienização	Faca/tesoura de corte	v	v	-	v
	Bancada/tabuleiro	v+	v	-	v
	Ralo lava loiça	v	v+	-	-
	Fatiadora - Queijo	-	-	v	-
	Fatiadora - Fiambre	-	-	v	-
	Fatiadora - Leitão	-	-	-	v

Legendas: (v) amostra analisada; (v +) amostra analisada e positiva para a presença de *Aeromonas*; (-) amostra não analisada. As amostras de superfícies foram recolhidas nas zonas onde circulam os alimentos frescos, talho e peixaria e em zonas onde circulam os alimentos processados e prontos para o consumo.

Anexo B - Lista dos *primers* e condições de reação de PCR.

	Genes (locus)	Dimensão dos fragmentos (pb)	Primers	Sequencia (5'-3')	Referências
Identificação ao nível de género	<i>gcat</i>	237	GCAT F GCAT R	CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT	Chacón <i>et al.</i> , 2002
	<i>rRNA 16S</i>	521	16S F 16S F	ACGCAGGCGGTTGGATAAGT GGCAACAAGGACAGGGGT	Marques 2011
Fingerprinting	n.a	]200-3000[	OPC19	GTTGCCAGCC	
	n.a	]200-3000[	1281	AACGCGCAAC	
	n.a	]200-3000[	ERIC F ERIC 2R	ATGTAAGCTCTGGGGATTAC AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG	Szczuka and Kaznowski, 2004
	n.a	]200-3000[	REP F REP R	IIICGICGICATCIGGC ICGICTTATCIGGCCTAC	
	n.a	]200-3000[	M13	GAGGGTGGCGTTCT	
Pesquisa dos determinantes de virulência	<i>aext</i>	226	aext F aext R	ATGCAGATTCAAGCAAACAC TTGCCGATCCACTCTTTGAT	Martino <i>et al.</i> , 2011
	<i>ahyB</i>	513	ela F ela R	ACACGGTCAAGGAGATCAAC CGCTGGTGTGGCCAGCAGG	
	<i>flaA/B</i>	608	fla F fla R	TCCAACCGT(C/T)TGACCTC G(A/C)(C/T)TGTTGCG(A/G)ATGGT	Sen and Rodgers, 2004
	<i>pla/lip/lipH3/alp-1</i>	382	lip F lip F	ATCTTCTCCGACTGGTTCCGG CCGTGCCAGGACTGGGTCTT	
	<i>hlyA</i>	130	ahh F ahh R	GCCGAGCGCCAGAAGGTGAGTT GAGCGGCTGGATGCGGTTGT	Wang <i>et al.</i> , 2003
	<i>alt</i>	480	alt F alt R	ATGACCCAGTCTGGCAGC GCCGCTCAGGGCGAAGCC	Kingombe <i>et al.</i> , 2009
	<i>ascV</i>	577	ascV F ascV R	CTCGAACTGGAAGAGCAGAATG GAACATCTGGCTCTCCTTCTCGATG	Martino <i>et al.</i> , 2011
	<i>act</i>	232	act F act R	GAGAAGGTGACCACCAAGAACA AACTGACATCGGCTTGAAGTC	Kingombe <i>et al.</i> , 2009
	<i>ast</i>	536	Ast F Ast R	GACTTCAATCGCTTCTCAACG GCATCGAAGTCACTGGTGAAGC	

Legenda: n.a – não aplicável

Anexo C - Isolados analisados na pesquisa de fatores de virulência e na análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Tabela 1. Isolados recuperados das diferentes fontes em Portugal.

Origem	Código	Amostra	Identificação	Origem	Código	Amostra	Identificação
Matadouro de suínos	A 1	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.	Hiperm.	A 85	Superfície <sup>a</sup>	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 3	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		A 92	Superfície <sup>a</sup>	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 4	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		A 93	Superfície <sup>a</sup>	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 5	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		A 94	Superfície <sup>a</sup>	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 6	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		A 95	Superfície <sup>a</sup>	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 7	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.	Fábrica de queijos	A 97	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 8	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		A 98	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 11	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		A 99	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 13	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		A 100	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 17	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		A 101	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 23	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.	A 102	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.	
	A 24	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.	A 104	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.	
	A 25	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.	A 105	Água	<i>Aeromonas</i> sp.	
	A 26	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.	INSA	A 108	Saladas	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 27	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		A 116	Saladas	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 28	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		A 123	Saladas	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 31	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		A 127	Saladas	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 33	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		S 1	Águas residuais	<i>Aeromonas</i> sp.
A 37	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.	S 2	Águas residuais	<i>Aeromonas</i> sp.		
A 38	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.	S 3	Águas residuais	<i>Aeromonas</i> sp.		
Hipermercado	A 42	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.	EPAL	S 4	Águas residuais	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 44	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		S 5	Águas residuais	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 50	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		S 6	Águas residuais	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 52	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		S 7	Águas residuais	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 53	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		S 8	Águas residuais	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 57	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		S 10	Águas residuais	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 61	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		S 13	Águas residuais	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 62	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		S 15	Águas residuais	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 68	Superfície	<i>Aeromonas</i> sp.		S 17	Águas residuais	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 73	Peixe	<i>Aeromonas</i> sp.		S 18	Águas residuais	<i>Aeromonas</i> sp.
	A 75	Peixe	<i>Aeromonas</i> sp.	A 255	Clinica	<i>A. hydrophila</i>	
	A 76	Peixe	<i>Aeromonas</i> sp.	A 256	Clinica	<i>A. hydrophila</i>	
	A 77	Carne	<i>Aeromonas</i> sp.	A 257	Clinica	<i>A. hydrophila</i>	
	A 78	Carne	<i>Aeromonas</i> sp.	A 258	Clinica	<i>A. hydrophila</i>	
				A 259	Clinica	<i>A. hydrophila</i>	

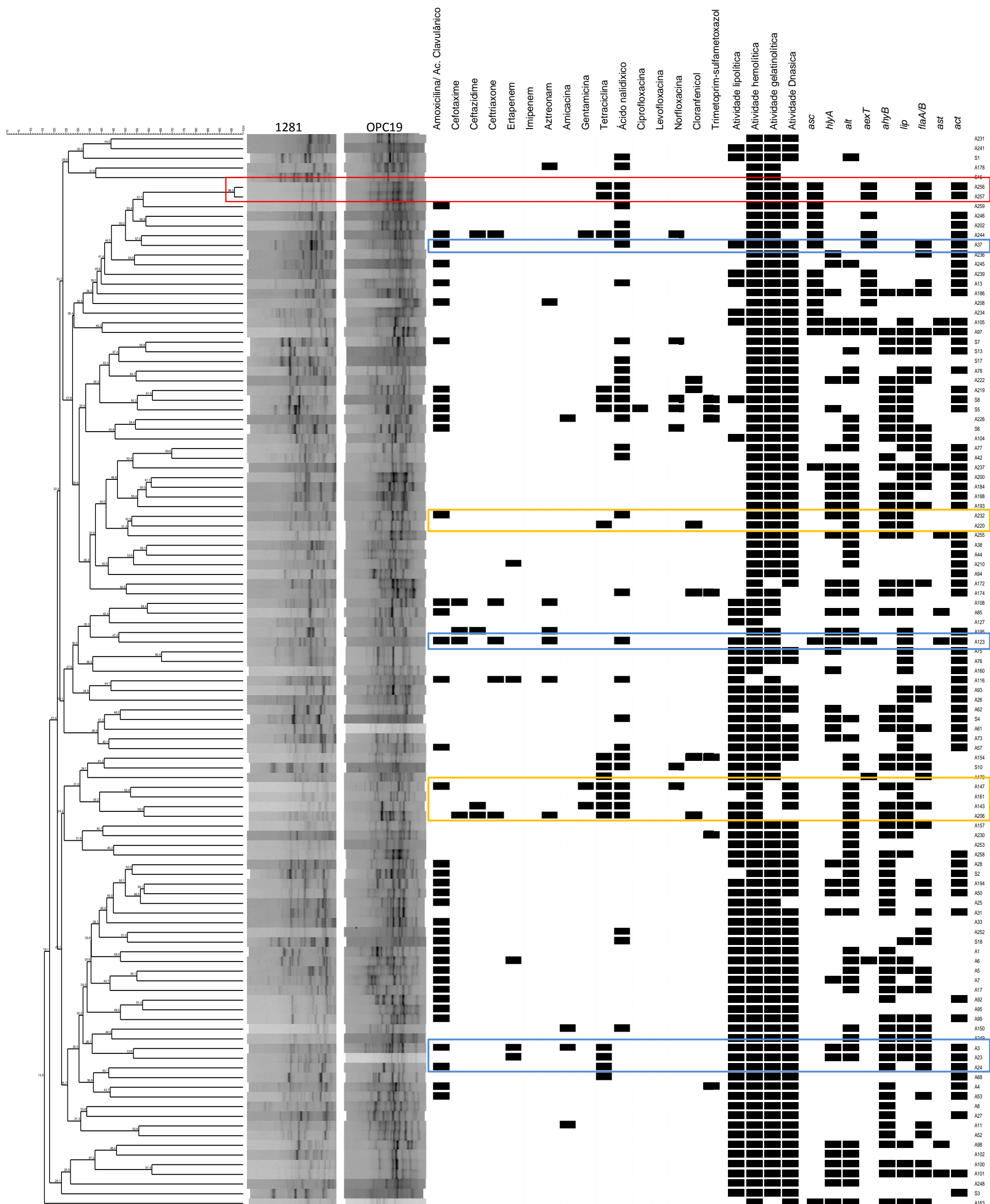
Legenda: (a) – amostras recolhidas após a higienização das respetivas superfícies.

INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo. EPAL - Empresa Portuguesa de Águas Livres

Tabela 2. Isolados provenientes de laboratórios colaboradores.

Origem	Código	Amostra	Identificação	Origem	Código	Amostra	Identificação
BD	A 154	Fezes de humanos	<i>A. caviae</i>	BR	A 230	Clinica	<i>A. caviae</i>
	A 157	Fezes de humanos	<i>A. caviae</i>		A 231	Clinica	<i>A. enteropelogenes</i>
	A 163	Fezes de humanos	<i>A. hydrophila</i>		A 232	Clinica	<i>A. hydrophila</i>
	A 172	Fezes de humanos	<i>A. hydrophila</i>		A 234	Clinica	<i>A. jandaei</i>
	A 174	Fezes de humanos	<i>A. hydrophila</i>		A 236	Clinica	<i>A. veronii</i>
BE	A 143	Clinica	<i>A. caviae</i>	DK	A 237	Clinica	<i>A. hydrophila</i>
	A 147	Clinica	<i>A. caviae</i>		A 239	Clinica	<i>A. veronii</i>
	A 150	Clinica	<i>A. caviae</i>		A 241	Clinica	<i>A. enteropelogenes</i>
	A 161	Clinica	<i>A. hydrophila</i>		A 244	Clinica	<i>A. veronii</i>
	A 206	Clinica	<i>A. veronii</i>		A 245	Clinica	<i>A. veronii</i>
	A 160	Água potável	<i>A. caviae</i>	A 246	Clinica	<i>A. veronii</i>	
	A 179	Água potável	<i>A. hydrophila</i>	A 248	Clinica	<i>A. hydrophila</i>	
	A 184	Água potável	<i>A. hydrophila</i>	A 249	Clinica	<i>A. hydrophila</i>	
	A 186	Água potável	<i>A. hydrophila</i>	A 252	Clinica	<i>A. media</i>	
	A 208	Água potável	<i>A. veronii</i>	A 253	Clinica	<i>A. caviae</i>	
	A 210	Água potável	<i>A. veronii</i>	VN	A 220	Peixe	<i>A. caviae</i>
	A 193	Peixe	<i>A. hydrophila</i>		A 222	Água	<i>A. caviae</i>
	A 194	Peixe	<i>A. hydrophila</i>		A 226	Sedimento	<i>A. caviae</i>
	A 200	Peixe	<i>A. hydrophila</i>	TJ	A 219	Sedimento	<i>A. caviae</i>
	A 202	Peixe	<i>A. hydrophila</i>				
A 178	Vegetais	<i>A. hydrophila</i>					

Legenda: Origens dos isolados: BD - Bangladesh; BE - Bélgica; BR - Brasil; DK - Dinamarca; TJ - Tailândia e VN - Vietnam.



Dendrograma global obtido a partir da análise conjunta dos perfis de RAPD-PCR e perfis de virulência e de suscetibilidade aos antimicrobianos. As relações de semelhança foi calculada com o coeficiente 'Simple Matching' para os genes de virulência, expressão de proteínas extracelulares ativas e resistência aos antimicrobianos (quadrados pretos – resultados positivos). O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para calcular as relações de semelhanças a partir dos perfis de RAPD após a normalização dos traços densitométricos. Os clusters foram formados com base no método de aglomeração baseado na média aritmética não ponderada (UPGMA).