

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Luciana Jatobá e Silva

***Aeromonas hydrophila* em organismos aquáticos no Vale do São
Francisco: Fatores de virulência e perfil de resistência à
antimicrobianos e metais pesados**

Petrolina - PE
2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Luciana Jatobá e Silva

***Aeromonas hydrophila* em organismos aquáticos no Vale do São
Francisco: Fatores de virulência e perfil de resistência à
antimicrobianos e metais pesados**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Petrolina - PE

2011

Silva, Luciana Jatobá e

S586a *Aeromonas hydrophila* em organismos aquáticos no Vale do São Francisco: Fatores de virulência e perfil de resistência à antimicrobianos e metais pesados / Luciana Jatobá e Silva. -- Petrolina, PE, 2011.

61f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina, PE, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Bibliografia

1. *Aeromonas hydrophila*. 2. Peixes - Patógeno. 3. *Aeromonas spp* - Resistência a Antimicrobianos. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 589.95

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca

SIBI/UNIVASF

Bibliotecário: Lucídio Lopes de Alencar

Dedicatória

Dedico a pessoa que sempre será o meu exemplo de vida e de quem sempre me orgulharei, meu pai, Francisco Lima *in memoriam*.

Agradecimentos

A Deus, que nos momentos mais difíceis traz a bonança, em um desses momentos, fez o meu caminho cruzar com o caminho do meu orientador, Professor Mateus Matiuzzi, quando me apaixonei pela pesquisa.

A minha família, mesmo estando distante, o apoio e o amor sempre foram presentes. Ao meu pai, Francisco, o meu coração sente você ao meu lado todos os dias; a minha mãe, Lícia, muito carinho e muita dedicação; aos meus irmãos, Marcos e Francisco, a amizade nos une e nos faz cúmplices; as minhas cunhadas, Adriana e Grace e os meus sobrinhos, meus pequenos grandes amores, Gabi, Mateus e Marcos José. Vocês são o meu maior incentivo nas conquistas dos meus objetivos.

Ao grande homem, professor orientador Mateus Matiuzzi, seus ensinamentos, conselhos e amizade nunca serão esquecidos, cada palavra dita está guardada, principalmente as que servem pra vida, elas me deixaram muito emocionada, mesmo quando eram ditas pra outras pessoas, obrigada por ter acreditado no meu potencial e por me apoiar em todos os momentos. Deus me deu um presente quando tive a oportunidade de ser orientada por você, essa sorte não é para todos.

Ao meu namorado e amigo, Rodolfo, pela paciência e ensinamentos na minha chegada ao laboratório, pelas conversas e conselhos quando amigos e pelo amor duradouro e verdadeiro de companheiros que sempre seremos.

A professora Adriana Mayumi Yano de Melo pelas dicas e sugestões sempre pertinentes.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF, Ceiça, Cari, Wellington, Evandro, Grace, Samile, Renata, Layse, Naedja, Samira, Deni, Chirles, Isa, Eliene, Jarbas, Gilvan, Mírian, Aldo, Marielle, Milka, André e todos que estiveram presentes nos dias alegres de trabalho, obrigada pela ajuda e pela amizade.

Rodolfo, Cari, Wellington, Ceiça e Samile, os fins de semana no laboratório não seriam nada fáceis se vocês não estivessem presentes.

A Fabiane e a professora Dra. Rosmari Hörner, do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do curso de Farmácia da UFSM-RS, onde desenvolvi parte do meu experimento.

Aos colegas do mestrado, pelas trocas de experiência e pelas risadas.

A minha grande amiga e irmã Thê, por me ouvir sempre e me entender como sou, sem questionar os meus defeitos.

Aos professores Cristina Krewer e Arthur Mascioli, pelo apoio em um momento muito difícil da minha vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, pela oportunidade de estar entre os discentes do curso. Por todo apoio que nos é dado.

A CODEVASF, na pessoa do colega de curso, Rozzano, pelo apoio ao desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia, a diretora de ensino, Fátima Palitot e o coordenador Erbes Cintra, pela compreensão e incentivo na finalização dessa etapa alcançada com muito esforço.

A FACEPE pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Aos funcionários do *Campus* de Ciências Agrárias da UNIVASF.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

E a todos que estiveram envolvidos direta ou indiretamente com o desenvolvimento desse trabalho, serei eternamente grata.

RESUMO

O Vale do São Francisco possui grande tradição na pesca e produção de peixes. Para o desenvolvimento desta atividade econômica é necessário o desenvolvimento de estratégias para o controle de patógenos responsáveis por enfermidades consideradas como limitantes no desenvolvimento dos animais de cultivo. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a resistência que isolados de *Aeromonas hydrophila* apresentam frente a antimicrobianos e metais pesados e identificar a presença de mecanismos que interferem nessa resistência, como presença de plasmídeos e bomba de efluxo. A caracterização taxonômica de *Aeromonas* spp. isoladas de peixes (*Oreochromis niloticus* e *Lophiosilurus alexandri*) e branchonetas (*Dendrocephalus brasiliensis*) do rio São Francisco foi realizado pela amplificação do gene rRNA 16S seguido de restrição enzimática. A concentração inibitória mínima para compostos antimicrobianos e metais pesados foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo utilizando temperatura de 27°C. A presença de plasmídeo nos isolados foi detectada, bem como o mecanismo de bomba de efluxo. 99 *Aeromonas* spp. foram identificadas, dessas 95 foram clivadas pela enzima *Bst*I e identificadas como *Aeromonas hydrophila*. Destes isolados, 92 (92,9%) foram positivos para presença de bomba de efluxo e 75 (75,7%) apresentam plasmídeos. As concentrações inibitórias mínimas (CIM's) foram variáveis frente aos seis antibióticos (ciprofloxacina, gentamicina, ácido nalidíxico, sulfatrimetropim, oxacilina, oxitetraciclina), entretanto 100% dos isolados apresentaram múltipla resistência aos antimicrobianos testados, 95 (100%) isolados apresentaram resistência a concentrações de 512 µg/mL a três dos quatro metais avaliados (Cu²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺) e 40 (59,6%) ao Cd²⁺. Os isolados apresentaram resistência a maioria dos compostos testados. Essa resistência pode estar ligada a transferência de genes via plasmídeo entre bactérias e bomba de efluxo, bem como a contaminação do meio ambiente causando multiresistência.

Palavras-chave: peixe, patógeno, antimicrobiano, metal pesado, bomba de efluxo, plasmídeo.

ABSTRACT

The São Francisco Valley has wide tradition in fishing and fish production. Aiming to develop this economic activity is necessary to control pathogens associated to limiting diseases in aquaculture. The present study was performed aiming to evaluate the resistance of *Aeromonas hydrophila* isolates against antimicrobials and heavy metals and to identify the occurrence of resistance mechanisms codified in plasmid and efflux pump. The taxonomic characterization of *Aeromonas* spp. isolates from fish (*Oreochromis niloticus* and *Lophiosilurus alexandri*) and branchionets (*Dendrocephalus brasiliensis*) from São Francisco river was performed by amplification of 16S rRNA gene followed by enzymatic restriction. The minimal inhibitory concentration of antimicrobial drugs and heavy metals were determined by microdilution in broth technique at 27°C. The plasmid presence of plasmids in the isolates was determined, as well as the occurrence of efflux pumps. Ninety nine *Aeromonas* spp. were identified by PCR being 95 classified as *Aeromonas hydrophila* by enzymatic restriction. From these isolates, 92 (92,9%) shown efflux pump and 75 (75,7%) carry plasmids. The minimal inhibitory concentration were variable among the six tested antimicrobial drugs (ciprofloxacin, gentamicin, nalidixic acid, trimethopim-sulfamethoxazole, oxacillin, oxytetracycline), however 100% of the isolates presenting multiple resistance to tested antimicrobial drugs. Ninety five (100%) of isolates were resistant to 512 µg/mL concentrations of three from four heavy metals tested here (Cu²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺) and 40 (59,6%) to Cd²⁺. The isolates presented resistance to several tested substances. This resistance may be associated to gene transfer by plasmids and efflux pump, as well as the environment contamination that cause multiresistance.

Key Words: fish, pathogen, antimicrobial, heavy metal, efflux pump, plasmid.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
DNA	Ácido desoxirribonucléico
H	Hora
L	Litro
MG	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
PB	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
TTC	Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio

LISTA DE SÍMBOLOS

N.º	Número
%	Porcentagem
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Pág.

Tabela 1. Integron / gene que confere resistência a antimicrobianos descritos em <i>Aeromonas</i> spp.....	20
---	----

Capítulo 2

Tabela 1. Concentrações inibitórias de isolados de <i>Aeromonas hydrophyla</i> frente a metais pesados e drogas antimicrobianas	43
Tabela 2. Concentrações bactericidas de isolados de <i>Aeromonas hydrophyla</i> frente a metais pesados e drogas antimicrobianas.	44

LISTA DE FIGURAS

	Capítulo 2	Pág.
Figura 1. Gel de eletroforese a 0,7% do DNA plasmideal extraído dos isolados de <i>A. hydrophila</i> , onde cr: DNA cromossomal e pl: DNA plasmideal.....		45

SUMÁRIO

	Pág
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	viii
Lista de Símbolos	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xi
Introdução	01
Capítulo 1 – <i>Aeromonas</i> spp: relação entre a virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados	04
Resumo.....	05
Abstract.....	06
1. Introdução.....	07
2. Revisão Bibliográfica.....	08
2.1 Piscicultura.....	08
2.2 Gênero <i>Aeromonas</i>	09
2.3 Fatores de virulência.....	12
2.4 Resistência aos antimicrobianos.....	14
2.5 Resistência aos metais pesados.....	17
2.6 Mecanismos genético de transmissão de resistência.....	18
3. Considerações finais.....	21
4. Referências bibliográficas.....	22
Capítulo 2 – Resistência a compostos antimicrobianos, presença de bomba de efluxo e plasmídeos em <i>Aeromonas hydrophila</i> obtidas de organismos aquáticos no Vale Submédio do São Francisco	28
Resumo.....	29
Abstract.....	30
1. Introdução.....	31
2. Material e Métodos.....	33
Procedência do material biológico.....	33
Identificação molecular dos isolados.....	33
Resistência a antibióticos e metais pesados.....	34
Bomba de efluxo.....	34
Detecção de plasmídeo.....	34
3. Resultados.....	35
Caracterização molecular e restrição enzimática.....	35
Resistência aos antimicrobianos.....	35

Sensibilidade aos metais pesados.....	35
Presença de Bomba de Efluxo.....	36
Presença de Plasmídeo.....	36
4. Discussão.....	36
5. Conclusões.....	39
Agradecimentos.....	39
Referências bibliográficas.....	40
Considerações Finais.....	45
Referências Bibliográficas.....	47
Anexos.....	48

INTRODUÇÃO

A piscicultura é um tipo de exploração animal que vem se tornando cada vez mais importante como fonte de proteína para o consumo humano. Observa-se o aumento no número de espécies sendo cultivadas, além da realização de pesquisas intensivas sobre novas espécies passíveis a serem criadas em cativeiro. Sempre quando há grande concentração de animais aumenta as condições favoráveis ao aparecimento de doenças, quando em criações intensivas esse fator parece ser agravado, constituindo ambiente adequado a surtos epizooticos, devido à presença de diferentes organismos patogênicos, que em condições naturais teriam expressões mínimas (PAVANELLI et al., 2002).

O aumento na prevalência de enfermidades bacterianas em peixes leva a perdas significativas na produção aquícola, afetando o desenvolvimento econômico do setor em muitos países. No Brasil, as bactérias do gênero *Aeromonas* são um dos principais causadores de consideráveis perdas na piscicultura constituindo-se de importantes patógenos de peixes encontrados na água, solo, alimentos, fezes de humanos e animais (GRAM et al., 1999). Estas bactérias são importantes agentes de gastroenterites transmitidas aos seres humanos pelo contato e consumo de carne e água contaminadas (ABDULLAH et al., 2003).

Membros do gênero *Aeromonas* pertencem a família Aeromonadaceae são bactérias anaeróbicas facultativas, bacilos gram-negativos, encontrados em diversos ambientes, incluindo solo e água (NAM e JOH, 2007). Por muitos anos, a taxonomia da *Aeromonas* spp. foi desconhecida e depois de significativas revisões, parece razoavelmente esclarecida. A técnica de amplificação do DNA por PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) fornece uma ferramenta altamente sensível e específica para a detecção destes micro-organismos através de seus produtos de secreção (CASCÓN et al., 1996).

As espécies *Aeromonas* spp. secretam muitas proteínas extracelulares, incluindo amilase, quitinase, elastase, aerolisina, nuclease, gelatinase, lecitinase, lipase e protease. Estas proteínas são conhecidas como fatores de virulência que causam doenças em peixes e humanos. Até agora, duas toxinas hemolíticas foram descritas: a *A. hydrophila* hemolisina (*hlyA*) e aerolisina (*aerA*). A maioria das

Aeromonas descritas como hemolíticas são relatadas com uma destas toxinas (NAM e JOH, 2007).

O uso indiscriminado de antimicrobianos para o controle de doenças ou como promotores de crescimento, aumenta a pressão da seleção sobre os micro-organismos, levando naturalmente ao aumento da resistência bacteriana. Em muitos sistemas aquáticos, resíduos de metais contaminantes são de grande significância, ocasionado em parte pelas atividades industriais e de mineradoras (MATYAR et al., 2009). A contaminação dos rios com esgotos municipais e efluentes industriais resulta em ocorrência de micro-organismos patogênicos e metais tóxicos além dos limites máximos permitidos. Os peixes expostos a essas condições apresentam concentrações desses contaminantes em diferentes órgãos (PATHAK e GOPAL, 2004). A grande contaminação do meio ambiente com metais funciona como agente seletivo na proliferação de resistência a antibióticos. Diferentes níveis e tipos de contaminações por metais sugerem mecanismos no processo de co-seleção dessa resistência (BAKER-AUSTIN et al., 2007).

As bactérias possuem diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana, dentre esses podemos citar a bomba de efluxo, que são proteínas integrantes da membrana plasmática que agem bombeando as drogas do meio intracelular para o meio extracelular, antes mesmo que elas exerçam sua função. (PIDDOCK, 2006).

Além da proliferação das bactérias resistentes após a morte das bactérias sensíveis à droga, há também a possibilidade da transferência dos genes de resistência a outras bactérias que nunca foram expostas a tal antibiótico (VERSCHUERE et al., 2000). Considerando o ambiente aquático a troca de genes de resistência é estimulada devido a fácil movimentação dos micro-organismos e elementos genéticos móveis como os plasmídeos (SMITH, 2008). Diversos genes para resistência a metais pesados são codificados em plasmídeos e existe uma associação direta da resistência bacteriana aos antimicrobianos e aos metais pesados. Isto poderia ser explicado pela vantagem ambiental da co-seleção destas informações em um único plasmídeo, especialmente quando a bactéria estiver num ambiente poluído (YATES et al., 2004).

O isolamento e a caracterização taxonômica de *Aeromonas* spp., bem como a determinação da resistência as drogas antimicrobianas, metais pesados e detecção

de plasmídeos e bomba de efluxo permitem a adoção de práticas adequadas para a aquicultura e segurança alimentar no Vale do São Francisco.

CAPÍTULO 1

***Aeromonas* spp: fatores virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados**

(A ser submetido, como artigo de revisão, à Arquivos do Instituto Biológico)

***Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados**

***Aeromonas* spp.: virulence factors and resistance patterns to antimicrobial and heavy metals**

¹Luciana Jatobá e Silva, ^{II}Mateus Matiuzzi da Costa

¹Autor para correspondência: lucianajatoba@hotmail.com – Mestranda - UNIVASF – Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal – Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal – Campus Ciências Agrárias - Rodovia BR 407, 12 Lote 543 – Petrolina – Pernambuco - Brasil.

RESUMO

As bactérias do gênero *Aeromonas* spp. são considerados como patógenos oportunistas carreadores de múltiplos fatores de virulência. O fenômeno da resistência aos antimicrobianos e metais pesados constitui outro problema, podendo ocorrer por diferentes fatores, dentre eles o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, poluição ambiental e a presença de mecanismos de resistência, como bombas de efluxo, sendo que muitos destes podem ser transmitidos por elementos genéticos móveis como os plasmídeos. O objetivo desse estudo é fazer uma revisão sobre os fatores de virulência, resistência a antimicrobianos e metais pesados, bem como os mecanismos que podem intervir nessa resistência e sua transferência entre bactérias do gênero *Aeromonas*. Os estudos dos fatores envolvidos no mecanismo de surgimento da resistência, aliado aos estudos de biologia molecular fornecem subsídios para elaboração de métodos de controle e profilaxia destas enfermidades de impacto aos organismos aquáticos, seres humanos e meio ambiente.

Palavras chave: micro-organismos, fatores de virulência, plasmídeo, bomba de efluxo.

ABSTRACT

Bacteria from *Aeromonas* spp. genus are considered as opportunistic pathogens that can carry many virulence factors. The resistance phenomenon to antimicrobial drugs and heavy metals is another problem and may occur by several factors, as the indiscriminate usage, environmental pollution and the presence of resistance determinants as efflux pumps, being many of them transmitted by genetic mobile elements as plasmid. The purpose of this article is to review about the virulence factors, antimicrobial and heavy metal resistance, as well as the mechanisms that can help its transfer among *Aeromonas* genus bacteria. Studies of the resistance mechanisms associated to molecular biology could produce information about control and prophylaxis methods to this disease of impact on aquatic organisms, man and environment.

Key Words: microorganisms, virulence factors, plasmid, efflux pump.

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura é um tipo de exploração animal que vem se tornando cada vez mais importante como fonte de proteína para o consumo humano. A grande concentração de animais aumenta as condições favoráveis ao aparecimento de doenças, quando em criações intensivas, sendo esse fator agravante, causando surtos epizooticos, devido à presença de diferentes organismos patogênicos, que em condições naturais teriam expressões mínimas (PAVANELLI et al., 2008).

O aumento na prevalência de enfermidades bacterianas em peixes leva a perdas significativas na produção aquícola, afetando o desenvolvimento econômico do setor em muitos países. As bactérias do gênero *Aeromonas* são um dos principais causadores de perdas na piscicultura constituindo-se em importante patógeno encontrado na água, solo, alimentos, fezes de humanos e animais (GRAM et al., 1999). Estas bactérias são importantes agentes de gastroenterites transmitidas aos seres humanos pelo contato e consumo de carne e água contaminadas (ABDULLAH et al., 2003).

Por muitos anos, a taxonomia de *Aeromonas* foi desconhecida e depois de significativas revisões foi esclarecida. A técnica de amplificação do DNA por PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) fornece uma ferramenta altamente sensível e específica para a detecção destes micro-organismos através de seus produtos de secreção (CASCÓN et al., 1996).

As espécies de *Aeromonas* secretam muitas proteínas extracelulares, incluindo amilase, quitinase, elastase, aerolisina, nuclease, gelatinase, lecitinase, lipase e protease. Estas proteínas são conhecidas como fatores de virulência que causam doenças em peixes e humanos (NAM e JOH, 2007).

O uso indiscriminado de antimicrobianos para o controle de doenças ou como promotores de crescimento, aumenta a pressão da seleção sobre os micro-organismos, levando naturalmente ao aumento da resistência bacteriana. Em muitos sistemas aquáticos, resíduos de metais contaminantes possui significância, ocasionado em parte pelas atividades industriais e de mineradoras (MATYAR et al., 2009). A grande contaminação do meio ambiente com metais funciona como agente seletivo na proliferação de resistência a antibióticos. Diferentes níveis e tipos de contaminações por metais sugerem mecanismos no processo de co-seleção dessa resistência (BAKER-AUSTIN et al., 2006).

As bactérias possuem diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana, dentre esses, a bomba de efluxo, que são proteínas integrantes da membrana plasmática que agem bombeando as drogas do meio intracelular para o meio extracelular, antes mesmo que elas exerçam sua função (PIDDOCK, 2006).

Além da proliferação das bactérias resistentes após a morte das consideradas sensíveis à droga, há também a possibilidade da transferência dos genes de resistência a outras bactérias que nunca foram expostas a tal antibiótico (VERSCHUERE et al., 2000). Ressalta-se que no ambiente aquático a troca de genes de resistência é estimulada devido a fácil movimentação dos microorganismos e elementos genéticos móveis como os plasmídeos (SMITH, 2008). Assim, diversos genes para resistência a metais pesados são codificados em plasmídeos, sendo relatado a existência de uma associação direta da resistência bacteriana aos antimicrobianos e metais pesados. Tal fato poderia ser explicado pela vantagem ambiental da co-seleção destas informações em um único plasmídeo, especialmente quando a bactéria estiver num ambiente poluído (YATES et al., 2004).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PISCICULTURA

O Brasil se insere no contexto internacional como um dos países com grande potencial para a piscicultura, além de possuir vasta bacia hidrográfica, suas condições climáticas favorecem o cultivo de peixes de água doce. É cada vez maior a quantidade de espécies a ser cultivada, além dos estudos sobre novas espécies que podem ser criadas em cativeiro. Esse cultivo pode ocorrer de três formas distintas: regime extensivo, onde se observa apenas um aumento da população natural e não se utiliza alimentação artificial; o regime intensivo, onde se tem culturas de grande intensidade, com grande aumento populacional, visando maior produtividade, usando basicamente alimentação artificial; ou o regime semi-intensivo, nesse os peixes obtém alimento do meio ambiente com complementação artificial (PAVANELLI et al., 2008).

A produção brasileira de pescado estimada em 2009 foi de 1.240.813,0 toneladas, frente as três principais fontes de proteína animal no país, o pescado apresenta o maior crescimento, com 115,7%, seguido pelas aves (12,9%) e suínos (9,2%), enquanto a produção de carne bovina apresentou decréscimo na produção nacional (-8,6%). A aquicultura teve participação na produção total de pescado do Brasil com 33,5% (415.649,4 t); tendo na tilapicultura grande expansão, de 2003 a 2009 seu crescimento foi de 105%, de 64.857,5 t para 132.957,8 t. O Nordeste deteve 34% da produção nacional do pescado e em Pernambuco foi estimada em 23.477,1 toneladas, sendo a aquicultura continental responsável por 1.887,6 toneladas e a pesca extrativa continental 3.348,9 toneladas (BRASIL, 2010).

O aumento populacional nas criações intensivas submete os animais a um estresse crônico, causado pela alta densidade, manipulação inerente a esse tipo de cultivo e degradação da qualidade da água por produtos estranhos ou produtos de excreção. Esse conjunto de fatores provoca nos peixes conseqüências que podem limitar as criações, como enfraquecimento dos animais, maior sensibilidade e menor resistência a infecções, dessa forma doenças causadas por micro-organismos patogênicos facultativos se instalam e podem causar grandes déficits na criação (PAVANELLI et al., 2008).

As bactérias são organismos que podem se apresentar com grande importância na piscicultura pelas doenças que provocam, as taxas de mortalidade se tornam muito altas em condições de estresse. Com a queda da reposta do sistema imunitário dos hospedeiros, bactérias como a *Aeromonas* spp. designadas como organismo patogênico secundário, manifestam sua patogenicidade, causando perdas no plantel (PAVANELLI et al., 2008).

2.2 GÊNERO *Aeromonas* E SUA IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA

Aeromonas spp. são bastonetes gram-negativos, de vida livre, anaeróbios facultativos, sendo antes classificadas junto ao *Vibrio* spp. e *Plesiomonas shigelloides* na família Vibrionaceae, porém estudos genéticos evidenciaram a necessidade de sua reclassificação em uma família própria, Aeromonadacea (GHENGHESH et al., 2008). COLWELL et al. (1986) propuseram esta reclassificação do gênero *Aeromonas*, uma vez que estas apresentam características filogenéticas distintas daquelas encontradas na família Vibrionaceae.

Os isolados de *Aeromonas* spp. apresentam grandes zonas de hemólise em ágar-sangue. Crescem rapidamente em meios de cultura utilizados para bastonetes gram-negativos, podendo ser confundidos com enterobactérias, sendo distinguidas destas por apresentarem ação positiva de oxidase (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

A identificação de espécies de *Aeromonas* spp. tem sido uma questão de discussão devido à sua diversidade fenotípica e genotípica. Neste sentido, a amplificação do gene rRNA 16S através da PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase), é uma forma boa e rápida de avaliar a identidade de todas as espécies conhecidas (BORRELL et al., 1997). BEAZ-HIDALGO et al. (2010) comprovaram que os testes moleculares são mais sensíveis que os métodos bioquímicos de identificação de bactérias deste gênero, em particular o sequenciamento de genes constitutivos, como *rpoD*, o qual se mostra como uma importante ferramenta para o futuro em particular para confirmar a identificação de *A. hydrophila*. CASTRO-ESCARPULLI et al. (2003) confirmaram a identificação fenotípica de 82 isolados de *Aeromonas* de peixes destinados ao consumo humano no México, por PCR através da amplificação do rRNA 16S. GHATAK et al. (2007), identificaram 53 cepas de *Aeromonas* de múltiplas origens de importância médica através da amplificação do gene rRNA 16S. Em um estudo objetivando avaliar presença de fatores de virulência e sensibilidade antimicrobiana os 19 isolados de água mineral também foram identificados por PCR com amplificação do rRNA 16S (SCOARIS et al., 2008).

NAWAZ et al. (2006) fizeram a caracterização taxonômica de *Aeromonas* spp. isoladas de peixes através de provas moleculares pela técnica de PCR-RFLP (Análise de Polimorfismo de Fragmentos de Restrição). Dos 81 isolados, 23 foram identificados como *A. hydrophila*, sete *A. trota*, seis *A. caviae*, 42 *A. veronni* e três *A. jandaei*.

Para os peixes, as bactérias do gênero *Aeromonas* spp. são consideradas bactérias oportunistas, organismos patogênicos facultativos e manifestam-se em hospedeiros enfraquecidos e/ou atacados por outros agentes etiológicos, sendo considerados invasores secundários, estabelecendo-se ao mesmo tempo em que outras infecções bacterianas, virais, parasitárias ou em decorrências de problemas nutricionais ou de estresse (PAVANELLI et al., 2008). Cinco são as espécies de importância clínica: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. schubertii*. Podem ser isoladas de répteis, anfíbios, peixes e de alguns pássaros. As espécies

A. hydrophila e *A. salmonicida* são importantes agentes patogênicos para peixes, multiplicando-se e produzindo exotoxinas em temperaturas de refrigeração.

Existem controvérsias sobre a patogenicidade da *Aeromonas* em humanos, mas o seu isolamento em fezes de indivíduos com diarreia e ausência de outro patógeno sugere seu papel como causador da doença, bem como nos casos de infecções generalizadas (FDA, 2010). ALTWEGG; GEISS (1989) associam *Aeromonas* a uma diversidade de infecções, como, septicemia, meningite, celulite, ectima gangrenoso, pneumonia, peritonite, conjuntivite, úlcera de córnea, osteomielite, artrite supurativa, miosite, infecção do trato urinário, endocardite, entre outros. Em indivíduos saudáveis os sintomas mais comuns são gastroenterites e os imunocomprometidos podem apresentar severos quadros de septicemia.

A. hydrophila foi o único patógeno isolado de fezes diarreicas de uma criança de um ano de idade no México, sendo a cepa identificada por provas bioquímicas e métodos genéticos e confirmada sua capacidade de produção de enzimas extracelulares relacionadas com virulência, proteases, lipases e hemolisinas (AGUILERA-ARREOLA et al., 2009). A grande dispersão da *Aeromonas* spp. no meio ambiente pode ser a hipótese mais provável de infecções por consumo de alimentos e água contaminada, mesmo sem grandes surtos terem sido relatados. *Aeromonas* é um patógeno que produz vários fatores de virulência, por esse motivo a infecção pode se apresentar complexa e multifatorial (CHOPRA; HOUSTON, 1999).

CHIM; SONG (2007) identificaram infecções por *Aeromonas* spp. em quatro pacientes com graves quadros de queimadura no hospital de Singapura, dois deles a partir do sangue e os demais a partir da lesão de pele, mesmo sem que as lesões tenham entrado em contato com água contaminada, sendo essa uma infecção pouco descrita. Os autores associam a importância com infecções de feridas a três espécies (*A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* biótipo veronii) predominando *A. hydrophila*, que geralmente está presente após o trauma e exposição da lesão a água contaminada ou solo. MANRESA et al. (2009) relataram dois casos pediátricos de foliculite causados por *Aeromonas hydrophila*, podendo estar associada com a água contaminada das instalações recreativas.

A presença de bactérias do gênero *Aeromonas* nos alimentos tem sido demonstrada. Normalmente destacam-se os alimentos que durante sua industrialização entraram em contato com a água, a qual é tida como habitat natural

das diversas espécies e principal fonte de contaminação (BIZANI; BRANDELLI, 2001). Esses micro-organismos são cada vez mais reconhecidos como patógenos entéricos e possuem fatores de virulência que contribuem para o desencadeamento da doença (NIHAL; SEDA, 2010). Estes autores isolaram 73 cepas de origem ambiental e alimentar com a finalidade de comparar suas características fenotípicas e de patogenicidade, sendo identificadas cepas potencialmente patogênicas, demonstrando o ser um risco significativo para a saúde pública. RALL et al. (1998) relataram que 48% das amostras de peixe pintado coletado em São Paulo estavam contaminadas com *Aeromonas* spp., tendo uma maior frequência de *A. caviae*, seguida de *A. hydrophila* e *A. sobria*.

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

As hemolisinas, citotoxinas, fosfolipases, DNase e habilidade de aderência às células epiteliais são diferentes produtos extracelulares biologicamente ativos presentes em espécies do gênero *Aeromonas* importantes como fatores de virulência (SCOARIS et al., 2008). As suas enterotoxinas produzem várias proteases que causam danos teciduais e auxiliam no estabelecimento da infecção. O trato gastrointestinal parece ser a principal fonte de infecção de *Aeromonas* spp. em humanos, acarretando uma doença com diarreia de curta duração variando desde diarreia aquosa, semelhante a cólera, até um quadro clínico de disenteria típico com fezes sanguinolentas e com muito muco, podendo ocasionar síndrome hemolítica urêmica esporadicamente (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

A virulência das *Aeromonas* é multifatorial, incluindo fatores de aderência, como S-layer e lipopolissacarídeos, sideróforos e uma matriz de exoenzimas e exotoxinas, ou seja, aerolisina/hemolisina, lipases, proteases, entre outros (WONG et al., 1998). SEN; RODGERS (2004) avaliaram a presença de seis fatores de virulência de cepas de *Aeromonas* isoladas na água de tratamento municipal nos Estados Unidos (elastase (*ahyB*), lipase (*pla/lip/lipH3/alp-1*) flagelina A e B (*flaA* e *flaB*), a presença de enterotoxinas, *act*, *alt* e *ast*), identificando uma grande variedade de combinações desses genes em diferentes linhagens da mesma espécie e um isolado de *A. hydrophilla* foi positivo para a presença dos seis fatores analisados.

SCOARIS et al. (2008) isolaram a partir de água de torneira, água mineral e de poço artesiano, 19 cepas de *Aeromonas* spp. para investigar sua capacidade de produção de diferentes fatores de virulência tais como, hemolisinas, formação de biofilme e produção de adesinas. A maioria dos isolados apresentou atividade hemolítica e no geral os isolados apresentaram-se hábeis para invadir células epiteliais. O consumo de água sem tratamento adequado pode ser considerado como um possível veiculador de *Aeromonas* spp. bem como os fatores de virulência presentes podem agravar o quadro da doença.

De 408 pacientes admitidos com gastroenterite aguda em dois hospitais do Rio Grande do Sul, em 27 (6,6%) foram isolados *Aeromonas* com maior prevalência em lactantes e crianças. Genes (*aerA*-aerolisina/hemolisina, *ahpA*-serina-protease, *satA*- glicerofosfolipidio-colesterol aciltransferase, *lipA*-lipase, e *ahyB*-elastase) e fatores de virulência (atividade hemolítica, proteolítica, lipolítica e formação de biofilme) foram identificados na maioria dos isolados de *A. hydrophila* e *A. veronii* biotipo *sobria*, com frequências menores em *A. caviae* (GUERRA et al. 2007).

BIZANE; BRANDELLI (2001) identificaram que espécies de *A. hydrophilla* e *A. sobria* isoladas a partir de água de abatedouro bovino foram positivas nas reações de hemólise e hemoaglutinação. As amostras de água foram provenientes de abastecimento e escoamento, sendo considerado como um fator contaminante, já que a água de abastecimento é utilizada na lavagem das carcaças.

CASTRO-ESCARPULLI et al. (2003) avaliaram 82 isolados de *Aeromonas* spp. a partir de 250 amostras de peixes congelados quanto a presença de fatores de virulência importantes para o desenvolvimento de uma infecção bacteriana, por meio da PCR, sendo observada a presença dos genes aerolisina/hemolisina, lipases extracelular (*lip*, *lipH3*, *pla*, *plc* e GCAT), protease e DNase. Para identificação fenotípica foram realizadas as provas de vermelho congo, aderência celular (HEp-2), bem como a atividade hemolítica, proteolítica, lipolítica, atividade de nuclease, sendo as amostras analisadas positivas.

KINGOMBE et al. (2010) usaram um novo método de PCR multiplex para detecção de três genes de virulência (*act/alt/ast*) em 537 isolados de *Aeromonas* a partir de alimentos. Os isolados apresentaram-se com aspecto multifatorial para genes de virulência, evidenciando assim contaminante de risco a saúde pública.

2.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Na medicina humana e veterinária existe ampla variedade de antimicrobianos em bases de registros, facilitando a escolha do agente terapêutico mais adequado. Essa condição não é a mesma na aquicultura, que tem um número limitado para os agentes terapêuticos por falta de dado de campo sobre a eficácia clínica gerada pelas terapias, bem como os ensaios laboratoriais têm sido raramente relatados. Na atual situação não existe uma relação de antimicrobianos adequados para tratar as condições específicas das doenças dos peixes. As diferenças fisiológicas entre as espécies de peixes e ambientes aquáticos são muito maiores do que para os animais terrestres. Isto interfere na forma de desenvolvimento da doença e de seu quadro clínico que pode variar de uma espécie pra outra ou na mesma espécie em diferentes condições ambientais, com necessidades farmacocinéticas específicas (SMITH et al., 2008).

Em virtude da grande diversidade do setor aquícola, o uso de agentes antimicrobianos não pode ser generalizado em todas as situações. Deve-se considerar os aspectos do antimicrobiano, tais como, dosagens, uso racional, espécies cultivadas, bem como a farmacodinâmica e a farmacocinética da droga a ser utilizada. Em relação aos agentes empregados na aquicultura mundial existem diferenças nos dados de um país para outro, mesmo com essas variações os agentes antimicrobianos mais utilizados pertencem ao grupo das tetraciclina, das sulfonamidas e das quinolonas de primeira e segunda geração (GUARDABASSI et al., 2010).

O uso indiscriminado de antibióticos na aquicultura leva ao desenvolvimento de bactérias com característica de múltipla resistência aos antimicrobianos (FRAPPAOLA; GUEST, 1986). Mutações e outras alterações genéticas no genoma bacteriano geram a base da resistência antimicrobiana. Essas alterações genéticas podem ocorrer de diversas maneiras, incluindo mutação espontânea e aquisição de elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos e integrons (GUARDABASSI et al., 2010).

ČÍŽEK et al. (2010) verificaram que os isolados de *Aeromonas* de duas espécies de carpas mostraram alta resistência à oxitetraciclina. Nesse estudo foi usada a técnica de PCR para avaliar a presença do gene *tet* que confere resistência à tetraciclina, sendo detectado em 40% (48/121) dos isolados. ISHIDA et al. (2010)

identificaram a presença de genes de resistência à tetraciclina em 26,3% (72/274) de bactérias gram-negativas isoladas de água de sistemas de piscicultura no norte do Egito. NAWAZ et al. (2006) após identificarem espécies de *Aeromonas* por PCR-RFLP, avaliaram a presença de 5 tipos de gene *tet* (A-E) por PCR multiplex; o gene *tetE* apresentou-se dominante sobre os demais, sendo identificado em 90% dos isolados (73/81). *Aeromonas* spp. isoladas a partir de sistemas de aquicultura na África do Sul apresentaram resistência a betalactâmicos, porém sensibilidade a cefalosporinas de segunda e terceira geração. 78,3% foram resistentes às tetraciclinas, com a amplificação do gene *tet* ABC em 70,3% e o gene *tet* DEH em 54,1% dos isolados (JACOBS; CHENIA, 2007).

MEJDI et al. (2010) determinaram a sensibilidade *in vitro* de *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp. isoladas de água do mar e mexilhões, frente a 12 antimicrobianos usando o método de Kirby-Bauer. A maioria dos isolados mostraram-se resistentes a pelo menos dois agentes e a ampicilina apresentou a maior porcentagem de resistência.

EVANGELISTA-BARRETO et al. (2010) isolaram sete espécies diferentes de *Aeromonas* no Rio Cocó no Ceará/Brasil e testaram a resistência frente a oito antibióticos, sendo que 60% apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. Múltipla resistência a antibióticos também foi observada em *A. caviae*, *A. sobria* e *A. veronii* bv. *sobria*. *A. caviae* apresentou o maior índice de múltipla resistência, sendo resistente a quatro antibióticos.

Entre os patógenos entéricos, esse é um problema grave nos países em desenvolvimento, onde existe uma alta taxa de gastroenterites e uso inadequado de antibióticos. Essa resistência é particularmente relevante na patogenicidade da *Aeromonas* spp., que além da clássica aos β -lactâmicos, múltiplas resistências vem sendo observada (GUERRA et al., 2007). A maioria das *Aeromonas* spp. é resistente à penicilina, ampicilina e carbenicilina. Em geral são sensíveis às cefalosporinas, aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprim e quinolonas. Como as síndromes diarréicas são autolimitantes, a terapêutica antimicrobiana é questionável e indicada nos casos mais graves, envolvendo pacientes imunodeprimidos ou com septicemias (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

BIZANI; BRANDELLI (2001) testaram 32 antibióticos em quinze isolados de *Aeromonas* a partir de água de abatedouro de bovinos. *A. hydrophilla* mostrou-se

menos sensível aos antibióticos testados. Todos os isolados apresentaram resistência aos betalactâmicos, sozinho ou em combinação com outro antimicrobiano. SCOARIS et al. (2008) observaram que 18 de 23 *Aeromonas* isoladas a partir de água mineral apresentaram múltipla resistência a três ou mais antibióticos testados, tendo a ampicilina 91% de resistência e o ciprofloxacina 100% de sensibilidade.

PALÚ et al. (2006) avaliaram a sensibilidade antimicrobiana de 83 *Aeromonas* isoladas de humanos e de alimentos, por meio da técnica de disco difusão. Os isolados de alimentos apresentaram resistência à ampicilina, cefaloxina e tetraciclina e os isolados de humanos apresentaram resistência a ampicilina, cefaloxina, sulfatrimetropim, cloranfenicol e tetraciclina. Treze isolados obtidos de vegetais foram testados pela técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e apresentaram resistência à tetraciclina.

As populações bacterianas são heterogêneas, cada uma com sua própria sensibilidade a determinado antimicrobiano. O uso de antimicrobianos exerce pressão seletiva sobre elas e o uso de concentrações reduzidas das drogas eliminaram as subpopulações mais sensíveis, levando ao crescimento excessivo da subpopulações menos sensíveis (GUARDABASSI et al., 2010).

2.5 RESISTÊNCIA AOS METAIS PESADOS

A contaminação dos rios com esgotos municipais e efluentes industriais resulta em ocorrência de micro-organismos patogênicos e metais tóxicos além dos limites máximos permitidos. Os peixes expostos a essas condições apresentam concentrações desses contaminantes em seus órgãos (PATHAK; GOPAL, 2005).

Um dos principais problemas ambientais é a contaminação de águas por metais como Cd, Zn, Cu, Pb, Ni, Hg e Co (DIELS et al., 2003). Atividades industriais e agrícolas podem liberar metais tóxicos no ambiente, constituindo um grave perigo para o ecossistema, bem como a saúde humana. Em muitos sistemas aquáticos, resíduos de metais contaminantes são de grande significância, ocasionado em parte pelas atividades industriais e de mineradoras (MATYAR et al., 2009). HASSEN et al. (1998) observaram cepas de *Pseudomonas* que apresentavam resistência a metais pesados (Cu, Zn, Cr, Cd, Co e Hg), tendo alta concentração mínima inibitória e largo

espectro de resistência antibiótica, concluindo que a *P. aeruginosa* pode ser utilizada como modelo para estudos ecotoxicológicos.

A grande contaminação do meio ambiente com metais funciona como agente seletivo na proliferação de resistência a antibióticos. Diferentes níveis e tipos de contaminações por metais sugerem mecanismos no processo de co-seleção dessa resistência (BAKER-AUSTIN et al., 2006). MATYAR et al. (2009) avaliaram a sensibilidade de *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp. frente a 15 antibióticos e seis metais pesados (Cádmio, Cobre, Cromo, Chumbo, Manganês e Zinco), sendo observado um elevado índice de resistência dos micro-organismos, sugerindo que as bactérias tenham a capacidade de transferência do gene de resistência via plasmídeos. A presença de plasmídeos e a sua transferência entre as bactérias proporcionam a estes micro-organismos uma transferência de caracteres essenciais à sua sobrevivência, como por exemplo, os plasmídeos responsáveis pela resistência antimicrobiana, degradação de metais pesados, ou mesmo aqueles que codificam toxinas bacterianas (ADAMS et al., 1998).

AKINBOWALE et al., (2007) determinaram alta resistência de isolados de *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp. frente a sete metais pesados (Cu, Pb, Cr, Mn, Zn, Cd, Co), por meio do método de Concentração Inibitória Mínima (CIM). PATHAK; GOPAL (2005) avaliaram a CIM visando identificar a resistência de bactérias isoladas de peixes frente a metais pesados (cobre, chumbo, manganês, cádmio e cromo), sendo evidenciada a tolerância em diferentes concentrações, com máxima para o manganês e mínima para o cromo.

O Cromo é um metal largamente utilizado em processos industriais têxteis e curtumes, quando liberado no meio aquático acaba se depositando nos peixes, dessa maneira as atividades celulares apresentam-se alteradas e os patógenos de peixes passam a ter alta resistência quando desafiados de forma crônica pelo cromo (STEINHAGEN et al., 2004).

2.6 MECANISMO GENÉTICO DE TRANSMISSÃO DE RESISTÊNCIA

A transferência de genes entre as bactérias foi primeiramente descrita por Griffith em 1928, em estudos de virulência de pneumococos em camundongos. Muitos dos genes adquiridos desta forma podem carrear informações deletérias as bactérias receptoras, reduzindo sua população, outras informações são neutras,

enquanto que algumas conferem uma vantagem seletiva aos micro-organismos, ou são carregadas por vetores que tem sua própria maquinaria de manutenção com potencial para se disseminar rapidamente numa população bacteriana (THOMAS; NIELSEN, 2005). Os plasmídeos podem carrear genes com diferentes funções: como fatores de virulência, como adesinas e toxinas, resistência a metais pesados, genes de metabolismo de substratos incomuns (SHERLEY et al., 2004)

Embora alguns pesquisadores acreditem que a resistência somente ocorra após o uso das drogas antimicrobianas, a grande diversidade dos genes envolvidos atribui uma origem antiga. Esta resistência pode ser devida provavelmente para proteção de compostos antibióticos produzidos por organismos do meio ambiente com *Streptomyces* spp, ou mutações de genes *housekeeping* (DCOSTA et al. 2006). Uma nova teoria propõe que os antibióticos possuem um duplo papel no meio ambiente e além da inibição de crescimento, bem estudada no meio acadêmico e clínico, estes seriam importantes como moléculas sinalizadoras podendo interagir com DNA do próprio microrganismo como de seus vizinhos (FAJARDO; MARTÍNEZ, 2008). Este papel se torna claro quando se avaliam outros compostos antimicrobianos não clássicos como as bacteriocinas, bem como pela relação entre *quorum sensing* e a produção de compostos antimicrobianos por bactérias como a *Burkholderia thailandensis* (FAJARDO; MARTÍNEZ, 2008; DUERKOP et al., 2009).

O ambiente aquático costuma reunir a água de ambientes próximos e com isto aproximar micro-organismos de diferentes origens (SENGELØV; SØRENSEN, 1998). O incremento no número de relatos da multiresistência entre isolados de ambientes aquáticos, como a *Aeromonas* spp., consideradas patógenos oportunistas e emergentes de peixes e humanos, tem sido observada em todo o mundo. Isto pode ser atribuído à transferência horizontal de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e integrons (PLOY et al., 2000; LEVERSTEIN-VAN-HALL et al., 2002).

A conjugação envolve a troca de DNA por plasmídeos via a formação de pili sexual ou F. A pili comunica o citoplasma de duas células e permite tanto a passagem de plasmídeos, como de segmentos de DNA cromossomal. Os integrons são pequenos plasmídeos que utilizam os maiores para a sua replicação e transmissão, enquanto que os transposons são sequências de DNA de replicação e transmissão autônoma. Estas duas moléculas são muito importantes para o desenvolvimento de resistência múltipla as drogas antimicrobianas (SHERLEY et al., 2004). Plasmídeos contendo determinantes para resistência múltiplas aos

antimicrobianos podem potencialmente transmitir essas características dos peixes os seres humanos, o que tem sido reportado para tetraciclina (RODHES et al., 2000). Vários plasmídeos e transposons têm sido encontrados em associação nos isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* spp. (RODHES et al., 2000; JACOBS; CHENIA, 2007), sendo descrita ainda a associação dos integrons com resistência múltipla aos antimicrobianos (LEVERSTEIN-VAN-HALL et al., 2002). A conjugação via plasmídeos é considerada importante no solo e ambiente aquático (TREVORS et al., 1987). No ambiente aquático a troca de plasmídeos entre bactérias de famílias diferentes pode ocorrer, o que explica a existência de bactérias multiressistentes em ambientes onde não exista uma grande pressão de seleção (KRUSE; SORUM, 1994).

A transformação é um processo pelo qual o DNA é captado diretamente do ambiente de onde a bactéria reside (solos, plantas, animais, outros microorganismos). Este processo já foi comprovado para organismos patogênicos e ambientais como *E. coli*, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. (BAUR et al., 1996; VRIES et al., 2001). DNA puro pode ser obtido de diferentes fontes como solo, fezes, água, silagem, saliva humana, alimentos e rações (THOMAS; NIELSEN, 2005).

A identificação de vários genes de resistência antibiótica (Tabela 1), em *Aeromonas* spp. evidencia o risco dessas bactérias servir como reservatório desses genes, que podem ser transferidos para outras bactérias na aquicultura (JACOBS; CHENIA, 2007). Múltiplos mecanismos de resistência antimicrobiana tornam-se uma ameaça a saúde pública, bem como se faz necessários tratamentos mais onerosos (ISHIDA et al., 2010).

Tabela 1 – Integron / gene que confere resistência a antimicrobianos descritos em *Aeromonas* spp.

Antimicrobiano	Integron / gene resistência	Referência
Tetraciclina	<i>Tet</i>	ČÍŽEK et al. 2010
Streptomycina	<i>Aad</i>	ISHIDA et al. 2010.
Trimetoprim	<i>Dfr</i>	ISHIDA et al., 2010.
Cloranfenicol	<i>Cat</i>	ISHIDA et al. 2010.
Quinolona / Fluorquinolona	<i>Qnr</i>	VERNER-JEFFREYS et al. 2009
Florfenicol	<i>Flor</i>	ISHIDA et al. 2010.
Betalactamases	<i>Bla</i>	VERNER-JEFFREYS et al. 2009

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação de sistemas de produção pesqueira, peixes, meio ambiente, água e alimentos constitui potencial veículo de infecções causadas por *Aeromonas* spp. Salienta-se ainda os diversos mecanismos de virulência e resistência que podem ser transferidos para outros indivíduos com potencial patogênico.

O uso indiscriminado e não autorizado de antimicrobianos é um fator agravante na seleção de bactérias resistentes, bem como a contaminação do meio ambiente por dejetos hospitalares e industriais.

É de fundamental importância a sensibilização dos piscicultores com relação ao uso racional de antimicrobianos, bem como de toda a população com o descarte do lixo e a preservação do meio ambiente, visto que a contaminação dos rios e lagos por metais e dejetos tem sido um dos fatores de grande importância para a co-seleção de bactérias resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, A. I.; HART, C. A.; WINSTANLEY, C. Molecular characterization and distribution of virulence associated genes amongst *Aeromonas* isolates from Libya. *Journal of Applied Microbiology*, v.95, p.1001-1007, 2003.
- ADAMS, C. A.; AUSTIN, B.; MEADEN, P. G.; McINTOSH, D. Molecular Characterization of Plasmid-Mediated Oxytetracycline Resistance in *Aeromonas salmonicida*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, n.11, p.4194-4201, 1998.
- AGUILERA-ARREOLA, M.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. H.; CASTRO-ESCARPULLI, G. Molecular and phenotypic characterization of *A. hydrophila*-like HG3 isolated of an infant with diarrhea in Mexico. *Bioquímica*, v.34, n.4, p.183-189, 2009.
- AKINBOWALE, O. L.; PENG, H.; GRANT, P.; BARTON, M. D. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.30, p.177-182, 2007.
- ALTWEGG, M.; GEISS, H. K. *Aeromonas* as a human pathogen. *Critical Reviews in Microbiology*, v.16, n.4, p.253-286, 1989.
- BAKER-AUSTIN, C.; WRIGHT, M. S.; STEPANAUSKAS, R.; McARTHUR, J. V. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, v.14, n.4, p.176-182, 2006.
- BAUR, B., HANSELMANN, K., SCHLIMME, W., JENNI, B. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.3673-3678, 1996.
- BEAZ-HIDALGO, R.; ALPERI, A.; BUJÁN, N.; ROMALDE, J. L.; FIGUEIRAS, M. J. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology*, v.33, p.149-153, 2010.
- BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and emagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.32, p.334-339, 2001.
- BORRELL, N.; ACINAS, S. G.; FIGUEIRAS, M. J.; MURCIA, A. J. M. Identification of *Aeromonas* Clinical Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n.7, p.1671-1674, 1997.
- BRASIL - IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. *Estatística da Pesca 2007 – Brasil - Grandes Regiões e Unidades da Federação*. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/documentos/estatistica-pesqueira/> Acesso: 06/11/2010.

BRASIL - MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. *Produção Pesqueira e Aquícola – Estatística 2008 e 2009*. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/#info-estatistica/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>. Acesso: 10/11/2010.

CASCÓN, A.; ANGUITA, J.; HERNANZ, C.; SÁNCHEZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; NAHARRO, G. Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.4, p.1167-1170, 1996.

CASTRO-ESCARPULLI, G.; FIGUEIRAS, M. J.; AGUILERA-ARREOLA, G.; SOLER, L.; FERNÁNDEZ-RENDÓN, E.; APARICIO, G. O.; GUARRO, J.; CHACÓN, M. R. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, v.84, p.41-49, 2003.

CHIM, H.; SONG, C. *Aeromonas* infection in critically ill burn patients. *J. Burns.*, v.33, p.756-759, 2007.

CHOPRA, A. K.; HOUSTON, C. W. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes and infection*, v.1, n.13, p.1129-1137, 1999.

ČÍŽEK, A.; DOLEJSKÁ, M.; SOCHOROVÁ, R.; STRACHOTOVÁ, K.; PIAČKOVÁ, V.; VESELÝ, T. Antimicrobial resistance and its genetic determinants in *Aeromonads* isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Microbiology*, v.142, n.3-4, p.435-439, 2010.

COLWELL, R. R.; MACDONELL, M. T.; LEY, J. Proposal to Recognize the Family *Aeromonadaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.36, n.3, p.473-477, 1986.

DCOSTA, V.M., MCGRAM, K.M., HUGHES, D.W., WRIGTH, G.D. Sampling the antibiotic resistome. *Science*, v.311, n.5759, p.374-377, 2006.

DIELS, L.; SPAANS, P. H.; ROY, S. V.; HOOYBERGHS, L.; RYNGAERT, A.; WOUTERS, H.; WALTER, E.; WINTERS, J.; MACASKIE, M. L.; FINLAY, J.; PERNFUSS, B.; WOEBKING, H.; PUMPEL, T.; TSEZOS, M. Heavy Metals removal by sand filters inoculated with metal sorbing and precipitating bacteria. *Hidrometallurgy*, v.71, p.235-241, 2003.

DUERKOP, B.A.; VARGA, J.; CHANDLER, J.R.; PETERSON, S.B.; HERMAN, J.P.; CHURCHILL, M.E.A.; PARSEK, M.R.; NIERMAN, W.C.; GREENBERG, E.B. Quorum-Sensing control of antibiotic synthesis in *Burkholderia thailandensis*, *Journal of Bacteriology*, v.191, n.12, p.3909-3918, 2009.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; CARVALHO, F. C. T.; VIEIRA, R. H. S. F., REIS, C. M. F.; MACRAE, A.; RODRIGUES, D. P. Characterization of *Aeromonas* species isolated from an estuarine environment. *Brazilian Journal Microbiology*, v.41, n.2, p.452-460, 2010.

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Yearbooks of Fishery Statistics - Summary tables*. 2008 Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/fi/STAT/summary/default.htm#aqua>>. Acesso em: 11 nov. 2010.

FAJARDO, A.; MARTÍNEZ, J.L. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current Opinion in Microbiology*, v.11, p.161-167, 2008.

FDA U. S. Food and Drug Administration. Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook *Aeromonas hydrophila*. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodbornellness/FoodbornellnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070523.htm>. Acesso: 08/11/2010.

FRAPPAOLA, P.J.; GUEST, G.B. Regulatory status of tetracyclines, penicillin and other antibacterial drugs in animal feeds. *Journal Animal Science*, v.62, p.86-92, 1986.

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

GHENGHESH, K. S.; AHMED, S. F.; EL-KHALEK, R. A.; AL-GENDY, A.; KLENA, J. *Aeromonas*-Associated Infections in Developing Countries. *Journal Infect Developing Countries*, v.2, n.2, p.81-98, 2008.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. *Guia de Antimicrobianos em Veterinária*. 1.º ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 267p.

GUERRA, I. M. F.; FADENELLI, R.; FIGUEIRÓ, M.; SCHREINER, F.; DECLAMARE, A. P. L.; WOLLHEIM, C.; COSTA, S. O. P.; ECHEVERRIGARAY, S. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p.638-643, 2007.

GRAM, L.; MELCHIORSEN, J.; SPANGGARD, B.; et al. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applies and Environmental Microbiology*, v.65, n.3, p.969-9732, 1999.

HASSEN, A.; SAIDI, N.; CHERIF, M.; BOUDABOUS, A. Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. [*Bioresource Technology*](#), v.65, n.1-2, p.73-82, 1998.

ISHIDA Y., AHMED, A. M.; MAHFOUZ, N. B.; KIMURA, T.; EL-KHODERY, S. A.; MOAWAD, A. A.; SHIMAMOTO, T. Molecular Analysis of Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria Isolated from Fish Farms in Egypt. *J. Vet. Med. Sci.*, v.72, n.6, p.727-734, 2010.

JACOBS, L.; CHENIA, H. Y. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *International Journal of Food Microbiology*, v.114, p.295-306, 2007.

KINGOMBE, C. I. B.; D'AOUST, J.; HUYS, G.; HOFMANN, L.; RAO, M.; KWAN, J. Multiplex PCR method for detection of three *Aeromonas* enterotoxin genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.76, n.2, p.425-433, 2010.

LEVERSTEIN-VAN-HALL, M. A.; PAAUW, A.; BOX, A. T. A.; BLOK, H. E. M.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, p.3038-3040, 2002.

KRUSE, H.; SØRUM, H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied and Environmental Microbiology*, V.60, n.11, p.4015-4021, 1994.

MANRESA, M. J.; VILLA, A. V.; GIRALT, A. G; GONZALEZ-ENSENAT, M. A.. *Aeromonas hydrophila* Folliculitis Associated with an Inflatable Swimming Pool: Mimicking *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Pediatric Dermatology*, v.26, n.5, p.601-603, 2009.

MATYAR, F.; AKKAN T.; UÇAK, Y.; ERASLAN, B. *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environ. Monit. Assess*, v.167, p.309-320, 2009.

MEJDI, S.; EMIRA, N.; ALI, M.; HAFEDH, H.; AMINA, B. Biochemical characteristics and genetic diversity of *Vibrio* spp. And *Aeromonas hydrophila* strains isolated from the Lac of Bizerte (Tunisia). *World Journal Microbiology Biotechnology*, v.26, p.2037-2046, 2010.

NAM, I. Y.; JOH, K. Rapid detection of virulence of *Aeromonas* isolated from a trout by hexaplex-PCR. *Journal of Microbiology*, v.45, n.4, p.297-304, 2007.

NAWAZ, M.; SUNG, K.; KHAN, S. A.; KHAN, A. A.; STEELE, R. Biochemical and Molecular Characterization of Tetracycline-Resistant *Aeromonas veronii* Isolates from Catfish. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.10, p.6461–6466, 2006.

NIHAL, Y.; SEDA, E. Virulence Properties and Characterization of *Aeromonads* Isolated from Foods of Animal Origin and Environmental Sources. *Journal of Food Protection*, v.73, n.5, p.855-860. 2010.

PALÚ, A. P.; GOMES, L. M.; MIGUEL, M. A. L.; BALASSIANO, I. T.; QUEIROZ, M. L. P.; FREITAS-ALMEIDA, A. C.; OLIVEIRA, S. S. Antimicrobial Resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. *Food Microbiology*, v.23, n.5, p.504-509, 2006.

PATHAK, S.P., GOPAL, K. Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. *Environmental research*, v.98, p.100-103, 2005.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. *Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. 3.^a ed. Maringá: Eduem, 311p. 2008.

PIDDOCK, L.J.V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. *Clin. Microbiol. Rev.* v.19 p.382-402, 2006.

PLOY, M.; LAMBERT, T.; COUTY, J.; DENIS, F. Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. *Clinical and Chemistry Laboratory Medicine*, v.38, p.483-487, 2000.

POLUNIN, M. *Alimentos que curam: um guia prático de alimentos essenciais para a boa saúde*. 2.^a. São Paulo: Marco-Zero, 160p. 2007.

RALL, V. L. M.; IARIA, S. T.; HEIDTMANN, S.; PIMENTA, F. C.; GAMBA, R. C.; PEDROSO, D. M. M. *Aeromonas* species isolated from pintado fish (*Pseudoplatystoma* sp.): virulence factors and drug susceptibility. *Revista de Microbiologia*, v.29, n.3, 1998.

RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J.; MEGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; PICKUP, R. W. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn/721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.3883-3890, 2000.

SCOARIS, D. O.; COLACITE, J.; NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; ABREU FILHO, B. A.; DIAS FILHO, B. P. Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.93, p.111-122, 2008.

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

SENGELØV, G.; SØRENSEN, S. J. Methods for Detection of Conjugative Plasmid Transfer in Aquatic Environments. *Current Microbiology*, v.37, p.274-280, 1998.

SHERLEY, M., GRODON, D.M., COLLIGNON, P.J. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. *Microbiology*, v.150, p.1539-1546, 2004.

SMITH, P. R.; BRETON, A. L.; HORSBERG, T. E.; CORSIN, F. Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. (Ed.) *Guide to Antimicrobial Use in Animals*. Blackwell Publishing, 2008. p. 207-216.

STEINHAGEN, D.; HELMUS, T.; MAURER, S.; MICHAEL, R. D.; LEIBOLD, W.; SCHARSACK, J. P.; SKOURAS, A.; SCHUBERTH, H. Effect of hexavalent carcinogenic chromium on carp *Cyprinus carpio* immune cells. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.62, p.155-161, 2004.

THOMAS, C.M., NIELSEN, K.M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews*, v.3, p.711-721, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4^a ed., São Paulo: Atheneu, 718p. 2004.

TREVORS, J. T.; BARKAY, T.; BOURQUIN, A. W. Gene Transfer among bacteria in soil and aquatic environments: a review. *Can Journal Microbiology*, v.33, p.191-198, 1987.

VERNER-JEFFREYS, D. W.; WELCH, T. J.; SCHWARZ, T.; POND, M. J.; WOODWARD, M. J.; HAIG, S. J.; RIMMER, G. S.; ROBERTS, E.; MORRISON, V.; C-BAKER, A. High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water. *Plos One*. v.4, n.12, p.83-88, 2009.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, n.4, p.655-671, 2000.

VIEIRA, R. H. S. F. *Microbiologia Higiene e Qualidade do Pescado*. 1.^a ed. Teoria e Prática. São Paulo: Varela, 380p. 2004.

VRIES, B.J., MEIER, P., WACKERNAGEL, W. The natural transformation on the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter sp.* by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiology Letters*, v.195, p.211-215, 2001.

WONG, C. Y. F., HEUZENROEDER, M. W., FLOWER, R. L. P. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiology*, v.144, p.291-298, 1998.

YATES, C.M., PEARCE, M.C., WOOHOUSE, M.E.J., AMYES, S.G.B. High frequency transfer and horizontal spread of apramycin resistance in calf faecal *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.54, n.2, p.534-537, 2004.

CAPÍTULO 2

Resistência a compostos antimicrobianos, presença de bomba de efluxo e plasmídeos em *Aeromonas hydrophila* obtida de organismos aquáticos do Vale do Submédio São Francisco

(A ser submetido para Applied and Environmental Microbiology)

Resistência a compostos antimicrobianos, presença de bomba de efluxo e plasmídeos em *Aeromonas hydrophila* obtida de organismos aquáticos do Vale do Submédio São Francisco

Resistance to antimicrobial compounds, efflux and plasmid presence in *Aeromonas hydrophila* in aquatic organisms from São Francisco Valey.

Luciana Jatobá e Silva e Mateus Matiuzzi da Costa

Resumo Através da técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), 95 *Aeromonas hydrophila* isoladas a partir de organismos aquáticos do Vale do São Francisco foram identificadas pela amplificação do gene rRNA 16S seguido de restrição enzimática. Com objetivo de avaliar a resistência dos isolados frente a anitimicrobianos e metais pesados foram realizados os testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), bem como o conteúdo de DNA plasmidial e a presença de bomba de efluxo foram determinadas. Noventa e dois (92-96,8%) isolados foram positivos para presença de bomba de efluxo e 75 (78,9%) apresentam plasmídeos de baixa massa molecular. As CIM's foram variáveis frente aos seis antibióticos (ciprofloxacina, gentamicina, ácido nalidíxico, sulfatrimetoprim, oxacilina, oxitetraciclina), entretanto 100% dos isolados apresentaram múltipla resistência a cinco antimicrobianos testados, 95 (100%) isolados apresentaram resistência a concentrações de 512 µg/mL a três dos quatro metais avaliados (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+}) e 40 (59,6%) ao Cd^{2+} . A resistência apresentada pelos isolados testados pode estar correlacionada a presença da bomba de efluxo, bem como genes de resistência podem ser transferidos entre bactérias no meio aquático via plasmídeo.

Palavras-chave: Antimicrobiano, metal pesado, plasmídeo, bomba de efluxo.

Abstract By Polymerase Chain Reaction (PCR), 95 *Aeromonas hydrophila* isolates from aquatic organisms of São Francisco Valley were identified by the amplification of 16S rRNA gene followed by enzymatic restriction. Aiming to evaluate the resistance of the isolates to antimicrobial and heavy metals tests to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration were performed, as well as the plasmidial DNA content of isolates and the efflux pump presence were determined. Ninety two (92-96.8%) were positive to efflux pump and 75 (78.9%) carries plasmids with low molecular weight. The MIC's were variable among the six antibiotics (ciprofloxacin, gentamicin, nalidixic acid, trimethopim-sulfamethoxazole, oxacillin, oxytetracycline), however 100% of isolates were resistant to multiple tested drugs groups, 95 (100%) showed resistance to three of tested heavy metals at 512 µg/mL (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+}) and 40 (59,6%) to Cd^{2+} . The resistance presented here may be associated to the efflux pump presence as well as resistance genes that can be transfer among aquatic bacteria by plasmids.

Key Words: Antimicrobial drugs, heavy metals, plasmids, efflux pump.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias podem apresentar grande importância na piscicultura, pelas doenças que provocam. Estas são responsáveis por infecções com elevadas taxas de mortalidade em condições de estresse. Com supressão do sistema imunitário dos hospedeiros, bactérias como a *Aeromonas* spp. designadas como organismos patogênicos secundários, manifestam sua patogenicidade, causando perdas no plantel (PAVANELLI et al., 2008).

Estas bactérias também são consideradas importantes patógenos alimentares. Normalmente destacam-se os alimentos que durante sua industrialização entraram em contato com a água, que é habitat natural das diversas espécies e a principal fonte de contaminação (BIZANI e BRANDELLI, 2001). Existem controvérsias sobre a patogenicidade da *Aeromonas* spp. em humanos, mas o seu isolamento em fezes de indivíduos com diarreia e ausência de outro patógeno sugere seu papel como causador da doença, bem como nos casos de infecções generalizadas (FDA, 2010).

A identificação de espécies de *Aeromonas*, em particular para espécies de interesse em ictiopatologia (BEAZ-HIDALGO et al., 2010), tem sido uma questão polêmica devido à sua heterogeneidade fenotípica e genômica. A amplificação do gene rRNA 16S através da PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase), é uma boa e rápida forma de avaliar as identidades de todas as espécies conhecidas (BORRELL et al., 1997).

Na medicina humana e veterinária existe uma grande variedade de antimicrobianos, facilitando a escolha do agente terapêutico mais adequado. Essa condição não é a mesma na aquicultura, que tem um número limitado para os agentes terapêuticos por falta de dados de campo sobre a eficácia clínica gerada pelas terapias, bem como os ensaios laboratoriais que raramente são relatados (SMITH et al., 2010). As populações bacterianas são heterogêneas, cada uma com sua própria sensibilidade a determinado antimicrobiano. O uso de antimicrobianos exerce pressão seletiva sobre elas e com o uso de concentrações reduzidas das drogas, as subpopulações mais sensíveis são eliminadas favorecendo o crescimento excessivo da subpopulações resistentes (GUARDABASSI et al., 2010).

Em muitos sistemas aquáticos, resíduos de metais contaminantes são de grande significância, ocasionado em parte pelas atividades industriais e de mineradoras (MATYAR et al., 2009). A contaminação dos rios com esgotos municipais e efluentes industriais resulta em ocorrência de micro-organismos patogênicos e metais tóxicos além dos limites máximos permitidos. Os peixes expostos a essas condições apresentam concentrações desses contaminantes em diferentes órgãos (PATHAK e GOPAL, 2005). A contaminação do meio ambiente com metais funciona como agente seletivo no desenvolvimento de resistência a antibióticos, especialmente a mediada por plasmídeos (BAKER-AUSTIN et al., 2006).

Embora alguns pesquisadores acreditem que a resistência somente ocorra após o uso das drogas antimicrobianas, a diversidade dos genes envolvidos atribui uma origem antiga provavelmente para proteção de compostos antibióticos produzidos por organismos do meio ambiente com *Streptomyces* spp, ou mutações de genes *housekeeping* (DCOSTA et al., 2006). As bactérias possuem diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana, dentre esses, a bomba de efluxo (PIDDOCK, 2006). A expressão concomitante de várias bombas de efluxo pode estar associada ao fenômeno de resistência a inúmeras categorias de antimicrobianos (BAMBEKE et al., 2003).

Mutações e outras alterações genéticas no genoma bacteriano geram a base da resistência antimicrobiana. Essas alterações genéticas podem ocorrer de diversas maneiras, incluindo mutação espontânea e aquisição de elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos e integrons (GUARDABASSI et al., 2010). Os plasmídeos podem carrear genes com diferentes funções: como fatores de virulência, como adesinas e toxinas, resistência a metais pesados, genes de metabolismo de substratos incomuns (SHERLEY et al., 2004). A conjugação via plasmídeos é considerada importante no solo e ambiente aquático (TREVORS et al., 1987). No ambiente aquático a troca de plasmídeos entre bactérias de famílias diferentes pode ocorrer, o que explica a existência de bactérias multiressistentes em ambientes onde não exista uma grande pressão de seleção (KRUSE e SORUM, 1994).

O objetivo do presente experimento foi realizar a caracterização molecular de *Aeromonas hydrophila* isoladas de organismos aquáticos do Vale do Submédio São

Francisco e avaliar suas características de sensibilidade frente a antimicrobianos e metais pesados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Procedência do material biológico

As bactérias utilizadas no experimento encontravam-se no banco bacteriano do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) e haviam sido previamente identificadas através de suas características morfológicas, tintoriais e bioquímicas (QUINN et al., 1994). Os isolados foram obtidos a partir do rim, tegumento, intestino e lesões de tilápias (*Oreochromis niloticus*) e pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*) com e sem sintomatologia clínica e de pool de branchonetas (*Dendrocephalus brasiliensis*) destinadas à alimentação de peixes carnívoros, os animais eram provenientes da Barragem de Sobradinho/BA e do Projeto Bebedouro da CODEVASF/PE.

Identificação molecular dos isolados

A identificação dos isolados foi realizada pela amplificação do rRNA 16S seguido de restrição enzimática, segundo metodologia descrita por GHATAK et al. (2007). Na PCR, utilizou-se os *primers* AerRFLP/F 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' e AerRFLP/R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' específicos para o rRNA 16S, sob as seguintes condições: tampão de enzima 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,5, 50 mM KCl), MgCl₂ 1 mM, dNTPs 0,2 mM, *primers* 0,3 ng, *Taq* DNA polimerase 0,125 U (Ludwig Biotech), 3 µL de DNA molde e água ultra pura (Ludwig Biotech) q.s.p para 20 µL. O programa de ciclagem de temperaturas teve o seguinte protocolo: primeiro passo de desnaturação a 95°C por 2 minutos seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C, anelamento a 50°C por 35 segundos e um passo de extensão a 72°C por 1 minutos. Após o término dos ciclos adicionou-se mais uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos. A digestão do produto de amplificação foi realizada com as enzimas *Bst*O I, *Mbo* I e *Pvu* II, seguindo para digestão as descrições do fabricante (Promega). O produto digerido foi visualizado em transiluminador com gel de agarose a 1% adicionado de brometo de etídeo.

Resistência a antibióticos e metais pesados

A sensibilidade frente a seis antibióticos (gentamicina, oxitetraciclina, ácido nalidíxico, sulfazotrim, ciprofloxacino, oxacilina) e quatro metais pesados (chumbo, cobre, manganês, cádmio) foi realizada a partir do método de microdiluição em caldo de acordo com o CLSI (2005) com a inoculação de 1×10^8 UFC/mL, usando concentrações antimicrobianas de 0,25 – 512 µg/mL (gentamicina, oxitetraciclina, ácido nalidíxico, sulfazotrim, oxacilina), 0,03 – 512 µg/mL (ciprofloxacina) e incubadas a 27°C por 24 h. A CIM foi determinada usando o cloreto de 2, 3, 5 trifeniltetrazólio (TTC). Foi incluindo nesse estudo uma cepa de referência padrão: *Escherichia coli* ATCC 35218.

Após a leitura dos resultados da CIM, a concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada através da semeadura das diluições onde não se visualizou turvação em caldo. Posteriormente as amostras foram semeadas Agar Mueller-Hinton e incubadas a 27°C por 24h.

Bomba de Efluxo

Semeou-se uma alçada da bactéria a partir do Agar TSA em Agar Mueller-Hinton com brometo de etídio (EtBr) numa concentração de 0,5 µg/ml (SUNDHEIM et al., 1992). As amostras foram cultivadas e em seguida incubadas por 24h a 37°C. A leitura foi realizada sob iluminação com luz ultravioleta e as colônias que emitiram luminescência foram consideradas negativas e as que não emitiram luminescência foram classificadas como positivas para bomba de efluxo.

Detecção de plasmídeo

A extração do DNA plasmidial foi realizada conforme descrições de KADO e LIU (1981). Nesta técnica, cultivos bacterianos em TSB foram centrifugados a 5.700 rpm por 10 minutos. O pellet celular foi suspenso em 1 mL do Tampão E (40 mM Tris acetato e 2 mM de EDTA, pH 7,9) e 2 mL de solução de lise contendo 3% de SDS, 50 mM de Tris e 2 N de NaOH. Esta mistura foi aquecida a 65°C por 20 minutos e na seqüência adicionado 2 volumes de fenol-clorofórmio. Após agitação esta foi submetida a nova centrifugação a 6.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante

foi extraído e submetido a eletroforese em gel de agarose a 0,7% corado com brometo de etídio a 0,5 µg/ml, sendo o mesmo observado sobre luz ultravioleta.

3. RESULTADOS

Caracterização molecular e restrição enzimática

Dos 134 isolados de peixes do Vale do São Francisco identificados bioquimicamente como *Aeromonas* spp. do banco de bactérias do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF, 99 (73,8%) foram confirmados como *Aeromonas* spp. a partir da PCR, com visualização de um produto de amplificação de aproximadamente 1.500 pb. Após a clivagem dos produtos de PCR, identificou-se que 95 (95,9%) isolados eram *A. hydrophila*, sendo estes isolados utilizados para os demais estudos.

Resistência aos antimicrobianos

A partir da CIM, 100% dos isolados apresentaram resistência à oxacilina e ao ácido nalidíxico; 92,6% à oxitetraciclina; 91,5% à sulfazotrim; 75,7% à ciprofloxacina e 28,4% à gentamicina (Tabela 1). A interpretação dos resultados baseou-se nos pontos de corte do CLSI (2005). Com relação aos resultados da CBM os valores encontrados iguais aos da CIM para oxacilina foram de 92,6% dos isolados, para a ciprofloxacina 61%, para a gentamicina 41%, o ácido nalidíxico 35,7%, a sulfatrimetoprim 12,6% e a oxitetraciclina 9,5%.

Sensibilidade aos metais pesados

A partir dos teste de microdiluição em caldo para avaliar a resistência dos isolados a metais pesados, 95 (100%) apresentaram resistência a concentrações superiores a 512 µg/mL para os metais Chumbo, Cobre, Manganês. Porém quando testados frente ao Cádmiio, 20 isolados tiveram a CIM maior que 128 µg/mL, 35 uma CIM maior que 256 µg/mL, 9 valores entre 8 e 64 µg/mL, e 35 apresentaram resistência superior a 512 µg/mL (Tabela 1).

Presença de bomba de efluxo

Em 95 isolados testados para presença de bomba de efluxo, 92 (92,9%) foram consideradas positivas no teste de triagem para esse mecanismo de resistência. Dois isolados que não apresentaram bomba de efluxo no teste de triagem apresentaram as menores CIM ao metal Cádmio (8 µg/ml e 16 µg/ml).

Presença de plasmídeo

Dentre os 95 isolados testados, 75 (78,9%) apresentaram plasmídeos com baixa massa molecular (Figura 1).

4. DISCUSSÃO

A confirmação de 99 *Aeromonas* spp. pela técnica de PCR demonstra que os testes moleculares são mais específicos que os métodos bioquímicos de identificação de bactérias deste gênero, como foi descrito por BEAZ-HIDALGO et al. (2010), que mencionam em particular o sequenciamento de genes constitutivos, como *rpoD*, o qual se mostra como uma importante ferramenta para o futuro em particular para confirmar a identificação de *A. hydrophila*. A utilização da técnica de sequenciamento pode ser interessante a fim de complementar a identificação dos isolados avaliados neste estudo.

A partir dos 99 isolados de *Aeromonas* spp., 95 foram identificados como *A. hydrophila* através da técnica de PCR seguida de restrição enzimática. Esta técnica tem se mostrado muito útil para identificação de isolados de *Aeromonas* em especial os patógenos de peixes, cuja heterogeneidade fenotípica e molecular é bem conhecida. Vários estudos têm comprovado a utilidade desta técnica para isolados de *Aeromonas* de diversas origens (BORREL et al., 1997; CASTRO-ESCARPULLI et al., 2003; SCOARIS et al., 2008). NAWAZ et al. (2006) ao realizarem a caracterização taxonômica de *Aeromonas* isoladas de peixes através de provas moleculares descreveram além de *Aeromonas hydrophila* outras espécies, como *A. trota*, *A. caviae*, *A. veronni* e *A. jandaei*.

Não existem relatos de *Aeromonas hydrophila* em organismos aquáticos no Vale Submédio São Francisco, mesmo com a escassez de dados deve-se

considerar esse micro-organismo como um importante patógeno, já que a piscicultura tem alto potencial de desenvolvimento na região.

O caráter oportunista de bactérias do gênero *Aeromonas* para os peixes é muito importante, uma vez que *A. hydrophila* foi isolada de peixes com e sem sintomatologia clínica. A virulência das *Aeromonas* é diversa e associada a fatores de aderência, como S-layer e lipopolissacarídeos, sideróforos, e uma matriz de exoenzimas e exotoxinas, como aerolisina/hemolisina, lipases, proteases, entre outras (WONG et al., 1998). SEN e RODGERS (2004) avaliaram a presença de seis fatores de virulência de cepas de *Aeromonas* isoladas na água de tratamento municipal nos Estados Unidos, elastase (*ahyB*), lipase (*pla/lip/lipH3/alp-1*) flagelina A e B (*flaA* e *flaB*), a presença de enterotoxinas, *act*, *alt* e *ast* e identificaram que existe uma grande variedade de combinações desses genes em diferentes linhagens da mesma espécie, sendo que um isolado de *A. hydrophila* foi positivo para a presença dos seis fatores analisados.

Outro aspecto relevante é o isolamento destas bactérias a partir de branchonetas, um microcrustáceo utilizado para alimentação de peixes e logo um importante veículo de transmissão de doenças aos peixes. A presença de patógenos bacterianos, como *Vibrio* spp. em organismos utilizados na alimentação de peixes já foi anteriormente descrito, inclusive com potencial patogênico para larvas de Artemias (SOTO-RODRIGUEZ et al., 2003).

Em relação aos agentes antimicrobianos observou-se elevadas taxas de resistência para todas as drogas testadas com exceção da gentamicina. Esses resultados são diferentes daqueles descritos por AKINBOWALE et al. (2007) para sulfazotrim e oxitetraciclina. PENDERS e STOBBERINGH (2008) ao analisarem a resistência de *Aeromonas* spp. isoladas de bagres descreveram a resistência moderada a oxitetraciclina e sensibilidade ao sulfazotrim e ciprofloxacina, resultados diferentes dos descritos aqui. Diferenças também observadas do estudo realizado por MATYAR et al. (2009) que descreveram a sensibilidade a gentamicina, ácido nalidixico, tetraciclina e resistência ao sulfazotrim. Estes estudos foram conduzidos sob condições diferentes das descritas na presente metodologia, principalmente para temperatura ou uso do método de difusão em disco, que não são recomendados pelo CLSI para testes de sensibilidade envolvendo organismos aquáticos (CLSI, 2005). Segundo MILLER et al. (2005) diferenças na temperatura de

crescimento e no método de teste podem levar a erros na interpretação dos resultados, em particular em organismos de crescimento lento em baixas temperaturas, o que é característico de micro-organismos obtidos de peixes e seu ambiente, tais como *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Shewanella* spp. e *Vibrio* spp..

A análise dos testes de atividade antimicrobiana dos metais pesados torna clara a alta resistência ao cobre, chumbo e manganês, que diferem dos achados de PATHAK e GOPAL (2005), que encontraram resistência mínima para o manganês. Porém em relação ao cádmio, os valores de CIM obtidos no presente estudo corroboram com os descritos pelos autores. AKINBOWALE et al. (2007) relataram sensibilidade de *Aeromonas* spp. isoladas de peixes ao cádmio, porém para manganês, cobre e chumbo observaram acentuada resistência. Recentemente, a resistência aos metais pesados cobre, chumbo, prata e zinco, mas não cobalto, cádmio e manganês foi associada à presença de bombas de efluxo, em especial as do grupo das proteínas de membrana plasmática (RND) (ANGELIS et al., 2010). Nesse estudo a baixa resistência ao cádmio foi observada nos isolados independentemente da presença de bomba de efluxo. Com relação à resistência observada ao manganês outros sistemas de efluxo também deveriam ser considerados. A resistência frente aos metais pesados pode estar ligada ao uso de fertilizantes em culturas agrícolas localizadas nas margens do Rio São Francisco.

Plasmídeos foram obtidos na maioria dos isolados de *Aeromonas hydrophila*. Estes elementos genéticos são associados à co-seleção da resistência aos metais pesados e antimicrobianos (BARKER-AUSTIN et al., 2006; SZCZEPANOWSKI et al., 2008). O ambiente aquático é propício à troca de plasmídeos entre os micro-organismos (KRUSE e SORUM, 1994), em particular os de pequeno tamanho como os identificados no presente estudo. Um aspecto importante a ser considerado é o grande risco da transferência de genes de resistência entre isolados bacterianos de ambientes aquáticos para terrestres (CHANG et al., 2007). A presença de plasmídeos transferíveis em *Aeromonas salmonicida* e a semelhança destes com elementos genéticos móveis de *Salmonella* spp. indicam a necessidade da adoção de programas de vacinação, manejo e biossegurança para o controle destes patógenos (MCINTOSH et al., 2008). Uma caracterização profunda dos plasmídeos observados nesse estudo é de grande valor, dado seu papel na patogenicidade e resistência a agentes agressores em bactérias (SUMMERS, 1996).

5. CONCLUSÕES

As análises desenvolvidas no presente estudo permitem concluir que há resistência às drogas antimicrobianas e metais pesados nos isoladas de *Aeromonas hydrophila* obtida de organismos aquáticos no Vale do São Francisco. Neste sentido o uso de drogas antimicrobianas nesta população deve ser evitada e quando realizada somente após avaliação da resistência *in vitro*. A resistência observada pode em parte ser associada a presença de bomba de efluxo e plasmídeos, o que alerta para riscos tanto para a saúde dos peixes como para a saúde pública.

AGRADECIMENTOS

À FACEPE (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Pernambuco) pela concessão da bolsa de pós-graduação para estudante Luciana Jatobá e Silva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akinbowale, O. L.; H. Peng, P. Grant, M. D. Barton. 2007. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **30**:177-182.

Angelis F., J. K. Leeb, J. D. O'Connell, L. J. W. Mierckeb, K. H. Erschuerenc, V. Srinivasanc, C. Bauvois, C. Govaerts, R. A. Robbins, J. Ruyschaert, R. M. Stroudb, G. Vandenbussche. 2010. Metal-induced conformational changes in ZneB suggest an active role of membrane fusion proteins in efflux resistance systems. *PNAS*. **107**:11038-11043.

Baker-Austin, C.; M. S. Wright, R. Stepanauskas, J. V. McArthur. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*. **14**:176-182.

Bambeke F. V., Y. Glupczynski, P. Plésiat, J. C. Pechère, P. M. Tulkens. 2003. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **51**:1055–1065.

Beaz-Hidalgo, R., A. Alperi, N. Buján, J. L. Romalde, M. J. Figueiras. 2010. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology*. **33**:149-15.

Bizani, D., A. Brandelli. 2001. Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and emagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. *Brazilian Journal of Microbiology*. **32**:334-339.

Borrell, N., S. G. Acinas, M. J. Figueiras, A. J. M. Murcia. 1997. Identification of *Aeromonas* Clinical Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. *Journal of Clinical Microbiology*. **35**:1671-1674.

Castro-Escarpulli, G., M. J. Figueiras, G. Aguilera-Arreola, L. Soler, E. Fernández-Rendón, G. O. Aparicio, J. Guarro, M. R. Chacón. 2003. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*. **84**:41-49.

Chang, Y., D. Y. Shih, J. Wang, S. Yang. 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 Diseases*. **59**:191-197.

CLSI/NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2005. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals: proposed guide-line. CLSI/NCCLS Document M49-P, CLSI/NCCLS, Wayne, PA (in press).

Dcosta, V.M., K. M. Mcgram, D. W. Hughes, G. D. Wrigth. 2006. Sampling the antibiotic resistome. **Science**. **311**:374-377.

FDA U. S. Food and Drug Administration. Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook *Aeromonas hydrophila*. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodbornellness/FoodbornellnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070523.htm>> Acesso em: 08/11/2010.

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

Guardabassi, I., I. B. Jensen. 2010. Guia de Antimicrobianos em Veterinária. 1ª ed. Porto Alegre:Artmed, 267pp.

Kado, C. L. S. T. Liu. 1981. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. **145**:1365-1373.

Kruse, H., H. Sørum. 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**:4015-4021.

Matyar, F., T. Akkan, Y. Uçak, B. Eraslan. 2009. *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environ Monit Assess*. **167**:309-320.

McIntosh, D., M. Cunningham, B. Ji, F. A. Fekete, E. M. Parry, S. E. Clark, Z. B. Zalinger, I. C. Giig, G. R. Danner, K. A. Johnson, M. Beattie, R. Ritchie. 2008. Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enteric* pSN254. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **61**:1221-1228.

Miller, R. A., R. D. Walker, J. Carson, M. Coles, R. Coyne, I. Dalsgaard, C. Giesecker, H. M. Hsu, J. J. Mathers, M. Papapetropoulou, B. Petty, C. Teitzel, R. Reimschuessel. 2005. Standardization of a broth microdilution susceptibility testing method to determine minimum inhibitory concentrations of aquatic bacteria. *Diseases of Aquatic Organisms*. **64**:211-222.

Nawaz, M., K. Sung, S. A. Khan, A. A. Khan, R. Steele. 2006. Biochemical and Molecular Characterization of Tetracycline-Resistant *Aeromonas veronii* Isolates from Catfish. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**:6461–6466.

Pathak, S. P., K. Gopal. 2005. Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. *Environmental Research*. **98**:100-103.

Pavanelli, G. C., J. C. Eiras, R. M. Takemoto. 2008 *Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. 3ª ed. Maringá:Eduem, 311pp.

Penders J., E. E. Stobberingh. 2008. Antibiotic resistance of motile aeromonads in indoor catfish and eel farms in the southern part of The Netherlands. *International Journal of Agents.* **31**:261-265.

Piddock L. J. V. 2006. Clinical relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. *Clinical Microbiology Rev.* **19**:382-402.

Quinn, P. J., M. E. Carter, B. Markey, G. R. Carter. 1994. *Clinical Veterinary Medicine.* London, Mosby-Year ed. 648pp.

Scoaris, D. O. , J. Colacite, C. V. Nakamura, T. Ueda-Nakamura, B. A. Abreu Filho, B. P. Dias Filho. 2008. Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. *Antonie van Leeuwenhoek.* **93**:111-122.

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

Sherley, M., D. M. Grodon, P. J. Collignon. 2004. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli.* *Microbiology.* **150**:1539-1546.

Smith, P. R., A. L. Breton, T. E. Horsberg, F. Corsin. 2010. Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. *Guia de Antimicrobianos em Veterinária.* Porto Alegre:Artmed, 250-262.

Soto-Rodriguez, S. A., A. Roque, M. L. Lizarraga-Partida, A. L Guerra-Flores, B. Gomez-Gil. 2003. Virulence of Luminous vibrios to *Artemia franciscana nauplii,* *Diseases of Aquatic Organisms.* **53**:231-240.

Summers, D.K. 1996. *The biology of plasmids.* Blackwell Science, 1^a ed., 175pp.

Sundheim, G., T. Hagtvedt, R. Dainty. 1992. Resistance of meat associated staphylococci to a quaternary ammonium compound. *Food Microbiology.* **9**:161-167.

Szczepanowski, R., T. Bekel, A. Goesmann, L. Krause, H. Krömeke, O. Kaiser, W. Eichler, A. Pühler, A. Schlüter. 2008. Insight into the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to antimicrobial drugs analysed by the 454-pyrosequencing technology. *Journal of biotechnology.* **136**:154-164.

Trevors, J. T., T. Barkay, A. W. Bourquin. 1987. Gene Transfer among bacteria in soil and aquatic environments: a review. *Canadian Journal of Microbiology.* **33**:191-198.

Wong, C. Y. F., M. W. Heuzenroeder, R. L. P. Flower. 1998. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiology.* **144**:291-298.

Tabela 1 – Concentrações inibitórias mínimas de isolados de *Aeromonas hydrophyla* frente a metais pesados e drogas antimicrobianas.

	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)														Resistência			
	0,03*	0,06*	0,12*	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	n	%	
M E T A L I S	Cd								1	1	1	4	19	34	18	18	18,9	
	Cu														95	95	100	
	Mn														95	95	100	
	Pb														95	95	100	
A N T I M I C I B I A N O S	Oxa								2					7	86	95	100	
	Sut				1	1	6	3	8	21	24	16	5		10	87	91,5	
	Cip	23	9	6	10	9	8	11	9	5	4	1				72	75,7	
	Oxi				3	4	26	9	11	14	6	4	5	7	6	88	92,6	
	Gen				6	29	33	18	5	1					2	1	27	28,4
	Nal				3	5	12	18	7	5	5	6	4	3	27	95	100	

* Concentrações utilizadas somente para CIM de Ciprofloxacino.

Área sombreada referente aos isolados resistentes, conforme pontos de corte (CLSI, 2005)

Tabela 2 – Concentração bactericida mínima (CBM) de isolados de *Aeromonas hydrophila* frente a metais pesados e drogas antimicrobianas.

		Concentração Bactericida Mínima (µg/mL)															
		0,03*	0,06*	0,12*	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	
M E T A L S	Cd									1	1	1	1	5	27	59	
	Cu															95	
	Mn															95	
	Pb															95	
A N T I M I C R O B I A N O S	Oxa									1		1			1	92	
	Sulf											3	7	3	4	78	
	Cip	17	12	5	9	5	8	6	5	10	8	3	1		3	1	
	Oxi									3	6	4	6	12	14	14	35
	Gen				4	12	15	18	9	12	2	7	3	3	5	5	
	Nal					3			3	9	2	7	4	7	2	13	46

* Concentrações utilizadas somente para CBM de Ciprofloxacina.

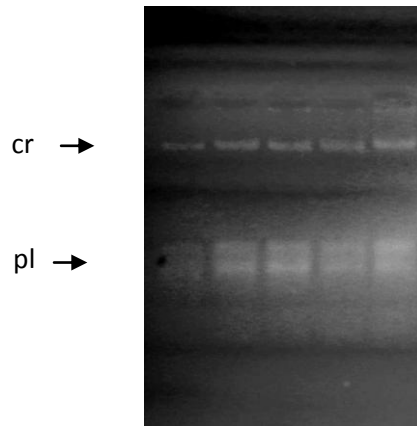


Figura1. Gel de eletroforese a 0,7% do DNA plasmideal extraído dos isolados de *A. hydrophila*, onde cr: DNA cromossomal e pl: DNA plasmideal

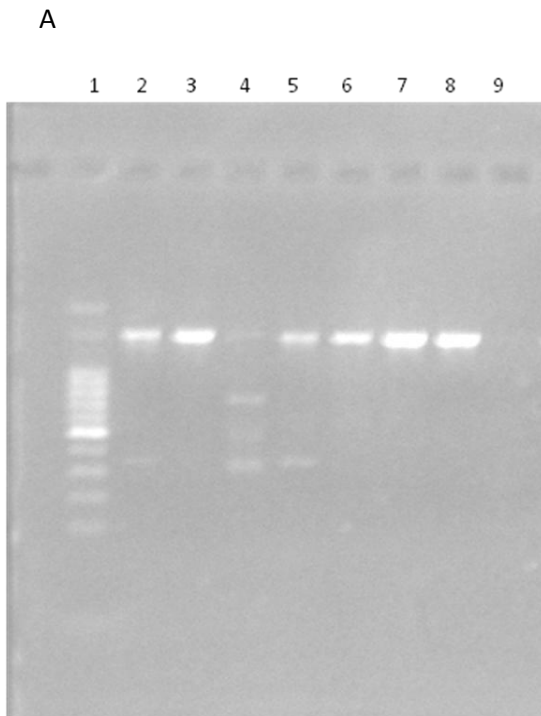
CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O uso indiscriminado e não autorizado de antimicrobianos é um fator agravante na seleção de bactérias resistentes, bem como a contaminação do meio ambiente por dejetos hospitalares e industriais. Neste sentido o uso de drogas antimicrobianas nesta população deveria ser evitada e quando realizada somente após minucioso planejamento.
- A resistência observada pode em parte ser associada a presença de bomba de efluxo e plasmídeos, o que alerta para riscos tanto para a saúde dos peixes como para a saúde pública.
- É de fundamental importância a sensibilização dos piscicultores com relação ao uso racional de antimicrobianos, bem como de toda a população com o descarte do lixo e a preservação do meio ambiente, visto que a contaminação dos rios e lagos por metais e dejetos tem sido um dos fatores de grande importância para a co-seleção de bactérias resistentes.

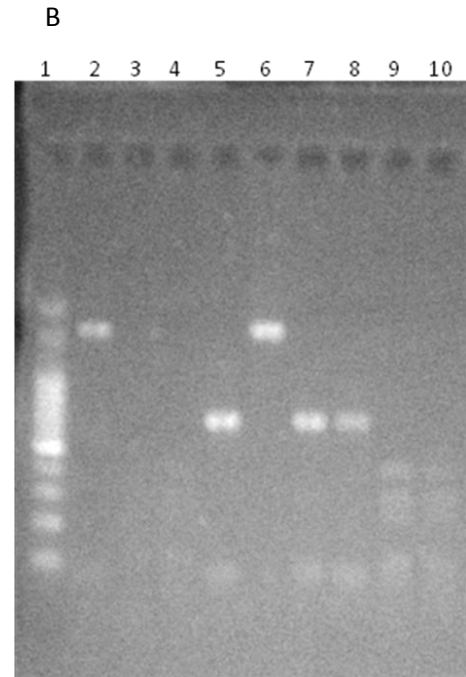
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, A. I.; HART, C. A.; WINSTANLEY, C. Molecular characterization and distribution of virulence associated genes amongst *Aeromonas* isolates from Libya. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.1001-1007, 2003.
- BAKER-AUSTIN, C.; WRIGHT, M. S.; STEPANAUSKAS, R.; McARTHUR, J. V. Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends in Microbiology**. Vol. 14, n. 4, pag.176-182, 2006.
- CASCÓN, A.; ANGUITA, J.; HERNANZ, C.; SÁNCHEZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; NAHARRO, G. Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.4, p.1167-1170, 1996.
- GRAM, L.; MELCHIORSEN, J.; SPANGGARD, B.; et al. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Applies and Environmental Microbiology**, v.65, n.3, p.969-9732, 1999.
- MATYAR, F.; AKKAN T.; UÇAK, Y.; ERASLAN, B. *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). **Environ Monit Assess**. 2009.
- NAM, I. Y.; JOH, K. Rapid detection of virulence of *Aeromonas* isolated from a trout by hexaplex-PCR. **Journal of Microbiology**, v.45, n.4, p.297-304, 2007.
- PATHAK, S.P., GOPAL, K. Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. **Environmental research**, v. 98, p. 100-103, 2005.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3ª ed. Maringá:Eduem, 311p. 2008.
- PIDDOCK L. J. V. Clinical relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. **Clinical Microbiology Rev**. Vol. 19, pag 382-402, 2006.
- SMITH, P. R.; BRETON, A. L.; HORSBERG, T. E.; CORSIN, F. Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guide to Antimicrobial Use in Animals**. Blackwell Publishing, 2008. p. 207-216.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE. W. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Vol. 64, n. 4, pag. 655-671, December 2000.
- YATES, C.M., PEARCE, M.C., WOOHOUSE, M.E.J., AMYES,S.G.B. High frequency transfer and horizontal spread of apramycin resistance in calf faecal *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1-4, 2004.

ANEXOS



1 - Marcador de peso molecular de 100 pb. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 - *Aeromonas* spp com aproximadamente 1500 pb. 9 - controle negativo.



1 - Marcador de peso molecular de 100 pb. 2, 6 - *Aeromonas* spp 5, 7, 8, 9, 10 - *Aeromonas hydrophila* clivada com enzima *Bst* I. 3, 4 - controle negativo.

Anexo 1. PCR_RFLP do rRNA 16S de isolados de *Aeromonas* spp., onde verifica-se a amplificação de fragmento de aproximadamente 1.500pb antes (A) e após (B) restrição enzimática.