

BRUNO STEFANELLO VIZZOTTO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Aeromonas*  
ISOLADAS NO PARANÁ NO PERÍODO DE 1999-2009**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cyntia Maria Telles Fadel Picheth

Co-orientador:  
Prof. Dr. Geraldo Picheth

CURITIBA  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

“...o propósito da vida não é ter  
uma lista de montanhas que escalou.  
É se tornar um excelente alpinista,  
pois assim será capaz de escalar  
todas as montanhas,  
mesmo as que não escolher...”

Daisaku Ikeda

## AGRADECIMENTOS

Tenho a agradecer primeiramente à Deus por tudo o que a vida tem me proporcionado, principalmente pela família que Ele me presenteou, pois é à eles que devo a coragem e a humildade que foram as marcas deste trabalho, meu pai Seu Dirceu, minha mãe Dona Elsa e meu irmão Leonardo.

Aos meus orientadores, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cyntia e Prof. Dr. Geraldo Picheth, sempre empenhados na arte de compartilhar o conhecimento, agradeço pela amizade, apoio e por toda a confiança depositada em mim e no meu trabalho.

Aos colegas de mestrado, Simone, Andressa, Patrícia, Letícia, Izabella, João e Mário, agradeço pelos muitos momentos de descontração, essenciais durante esta caminhada. Ao pessoal do laboratório de Microbiologia Clínica-UFPR, Cibelle, Mônica, Cristina, Carol, Carolzinha e Henrique, agradeço pelos muitos ensinamentos compartilhados e pela disposição de sempre estarem aptos a ajudar.

Ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR), pelo fornecimento das estirpes de *Aeromonas*, em especial ao pessoal do Laboratório de Bacteriologia Geral, Dr.<sup>a</sup> Sonia Farah, Vera, Lavinia e Karin, pela amizade e pelos muitos ensinamentos que me foram passados. Ao Dr. Marcelo Pilonetto, Diretor Geral do LACEN/PR, pela oportunidade de participar do grande momento na história do LACEN/PR que foi o diagnóstico dos casos de infecção pelo vírus H1N1.

Aos meus amigos de infância de Faxinal do Soturno/RS, Zeca, Guilherme e Flávia, aos meus ex-colegas de faculdade e amigos de Santa Maria/RS, Isabel, Anaqueli, Paulinha, Melina, Lisi, Márcia, Karen, Érico, Éder e Renata, que mesmo distantes sempre estiveram presentes em meu pensamento, dos quais sinto muita saudade e levarei comigo por onde for, agradeço por terem deixado suas marcas na minha história.

Aos professores Roberto Christ Vianna Santos e Juliana Fleck do Centro Universitario Franciscano (UNIFRA) de Santa Maria/RS, pela amizade e por terem sido os tutores que me ensinaram os primeiros passos no ramo das Análises Clínicas.

Enfim, dedico este trabalho à todo povo gaúcho, que com seu caráter heróico e valente mostra ao Mundo, a cada dia, o verdadeiro valor da expressão “...sirvam nossas façanhas de modelo à toda Terra...”.

## RESUMO

*Aeromonas* são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose, oxidase e catalase positivos, ubíquos em ambientes aquáticos e capazes de causar uma variedade de doenças em humanos, incluindo gastroenterite. As espécies mais comumente associadas com infecções em humanos são *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar sobria. Poucos são os dados disponíveis sobre *Aeromonas* no Brasil. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar estirpes de *Aeromonas* isoladas no Estado do Paraná durante o período de 1999 a 2009, utilizando a metodologia bioquímica convencional e automatizada e PCR-RFLP, assim como avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Setenta e quatro estirpes de *Aeromonas* foram analisadas, utilizando 26 testes bioquímicos convencionais, o sistema automatizado VITEK<sup>®</sup> 2 Compact e PCR-RFLP do gene 16S rDNA. Quatro espécies de *Aeromonas* foram encontradas: *A. caviae* (70,3%), *A. veronii* biovar sobria (17,6%), *A. hydrophila* (8,1%), e *A. trota* (4%). A identificação bioquímica convencional identificou corretamente 98,6% (73/74) das estirpes em comparação com a identificação molecular por PCR-RFLP. A identificação automatizada obteve 90,5% (67/74) de identificações corretas. Oito estirpes de *A. caviae* mostraram padrões de PCR-RFLP atípicos. Uma estirpe de *A. caviae* mostrou um padrão bioquímico incomum, o que levou a sua identificação errônea nos sistemas convencional e automatizado como *A. hydrophila*. A prevalência de *Aeromonas* foi maior na faixa de 0 a 10 anos de idade e nas cidades de Curitiba/PR (39%) e Paranaguá/PR (34%). O Sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact identificou duas das estirpes como *Vibrio vulnificus* e *V. cholerae*, o que foi prevenido com a utilização de NaCl 0,85% no preparo no inóculo. Foram observadas diferenças entre os perfis de resistência aos antimicrobianos identificados pelo sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, e aqueles obtidos pelo método de disco-difusão. Com exceção da ampicilina, cefalotina e cefazolina, cinquenta e quatro por cento das *Aeromonas* foram suscetíveis aos demais antimicrobianos testados. O conhecimento sobre as características fenotípicas e moleculares de *Aeromonas* será importante para os estudos epidemiológicos, o que poderá auxiliar no controle e tratamento das diarreias causadas por esse microrganismo.

Palavras-chave: *Aeromonas*, diarreia, Estado do Paraná, Identificação Bioquímica Convencional, Identificação Bioquímica Automatizada, Identificação Molecular.

## ABSTRACT

*Aeromonas* are gram negative rods, facultatively anaerobic, glucose fermenters, oxidase and catalase positive, ubiquitous in aquatic environments and capable to cause a variety of diseases in humans, including gastroenteritis. The species most commonly associated with human infections are *A. hydrophila*, *A. caviae*, and *A. veronii* biovar *sobria*. There are few data available on *Aeromonas* in Brazil. The aims of this work were to characterize strains of *Aeromonas* isolated in Parana state during the period of 1999 to 2009, utilizing conventional and automated biochemical methodologies and PCR-RFLP, and to evaluate antimicrobial susceptibility. Seventy four strains of *Aeromonas* were analysed utilizing 26 conventional biochemical tests, the VITEK<sup>®</sup> 2 Compact automated system and 16S rDNA gene PCR-RFLP. Four species of *Aeromonas* were found: *A. caviae* (70,3%), *A. veronii* biovar *sobria* (17,6%), *A. hydrophila* (8,1%), and *A. trota* (4%). The conventional biochemical identification identified correctly 98,6% (73/74) strains in comparing to the PCR-RFLP molecular identification. The automated identification showed 90,5% (67/74) of correctly identifications. Eight strains of *A. caviae* showed atypical PCR-RFLP profiles. One strain of *A. caviae* showed an uncommon biochemical pattern leading to its wrong classification by conventional and automated systems as *A. hydrophila*. The prevalence of *Aeromonas* was higher among people ages 0 to 10 years, and in the cities of Curitiba/PR (39%) and Paranaguá/PR (34%). The VITEK<sup>®</sup> 2 Compact system identified two of the strains as *Vibrio vulnificus* and *V. cholerae*, what was prevented with the use of NaCl 0,85% to prepare the inoculum. Some differences were observed between the resistance profiles to antimicrobials identified by the VITEK<sup>®</sup> 2 Compact system and the disc diffusion method. With the exception of ampicillin, cephalotin and cephazolin, fifty four per cent of the *Aeromonas* were susceptible to the others antimicrobials tested. The knowledge about phenotypical and molecular characteristics of *Aeromonas* will be important to epidemiologic research, and could help in the control and treatment of diarrhoea caused by this microorganism.

Keywords: *Aeromonas*, diarrhoea, Paraná state, Conventional Biochemical Identification, Automated Biochemical Identification, Molecular identification.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 –</b>	MAPA DO ESTADO DO PARANÁ, DESTACANDO AS LOCALIDADES DE ORIGEM DAS AMOSTRAS DE <i>Aeromonas</i> ANALISADAS.....	32
<b>FIGURA 2 –</b>	PADRÕES DE PCR-RFLP DO GENE 16S rDNA PARA ESPÉCIES DE <i>Aeromonas</i> , SEGUNDO BORRELL <i>et al.</i> , 1997.....	39
<b>FIGURA 3 –</b>	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS REFERENTES À FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES.....	41
<b>FIGURA 4 –</b>	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS REFERENTES À LOCALIDADE DOS PACIENTES.....	42
<b>FIGURA 5 –</b>	CONJUNTO DE PROVAS BIOQUÍMICAS EMPREGADO NA IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i> .....	43
<b>FIGURA 6 –</b>	TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS AVALIADO PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO.....	50
<b>FIGURA 7 –</b>	PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rDNA DE <i>Aeromonas</i> OBTIDO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR.....	51
<b>FIGURA 8 –</b>	PADRÕES DE PCR-RFLP DO GENE 16S rDNA REPRESENTATIVOS PARA AS ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i> ANALISADAS.....	52
<b>FIGURA 9 –</b>	PADRÕES DE PCR-RFLP ATÍPICOS OBSERVADOS PARA ESTIRPES COM PERFIL BIOQUÍMICO DE <i>A. caviae</i> e <i>A. hydrophila</i> .....	53
<b>FIGURA 10 –</b>	ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO 5' DOS GENES 16S rDNA DAS ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i> LACEN-19, <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966 e <i>A. caviae</i> ATCC 15467.....	54
<b>FIGURA 11 –</b>	SISTEMA OSIRIS™ (Bio-Rad) DE LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS HALOS DE INIBIÇÃO DOS TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	79
<b>FIGURA 12 –</b>	SISTEMA VITEK® 2 Compact.....	80
<b>FIGURA 13 –</b>	CARTÃO GN DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA VITEK® 2 Compact.....	81
<b>FIGURA 14 –</b>	FLUXOGRAMA DE ANÁLISE DAS AMOSTRAS NO SISTEMA AUTOMATIZADO DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E ANTIBIOGRAMA VITEK® 2 Compact.....	87

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 –</b>	FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE DAS ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i> EM ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA CONVENCIONAL E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DE ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003.....	44
<b>TABELA 2 –</b>	FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE PARA OS ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA REALIZADA PELO SISTEMA VITEK <sup>®</sup> 2 COMPACT.....	46
<b>TABELA 3 –</b>	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i> ENTRE OS MÉTODOS BIOQUÍMICOS CONVENCIONAL E AUTOMATIZADO.....	48
<b>TABELA 4 –</b>	PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i> AVALIADO PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO.....	49
<b>TABELA 5 –</b>	PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i> AVALIADO PELO MÉTODO AUTOMATIZADO VITEK <sup>®</sup> 2 Compact.....	50
<b>TABELA 6 –</b>	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i> ENTRE OS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA CONVENCIONAL E MOLECULAR.....	55
<b>TABELA 7 –</b>	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i> ENTRE OS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA E MOLECULAR.....	55

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1 –</b>	GRUPOS DE HIBRIDIZAÇÃO DE DNA, MOSTRANDO AS RESPECTIVAS GENOMOESPÉCIES E FENOESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNERO <i>Aeromonas</i> .....	17
<b>QUADRO 2 –</b>	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS AMOSTRAS ANALIZADAS.....	33
<b>QUADRO 3 –</b>	IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA UTILIZANDO NaCl 0,45% e 0,85% PARA O PREPARO DO INÓCULO .....	45
<b>QUADRO 4 –</b>	CONTEÚDO DOS POÇOS DO CARTÃO GN VITEK <sup>®</sup> 2 Compact.....	82
<b>QUADRO 5 –</b>	CONTEÚDO DOS POÇOS DO CARTÃO AST-GN09 VITEK <sup>®</sup> 2 Compact.....	83
<b>QUADRO 6 –</b>	MENSAGENS DE QUALIFICAÇÃO DO CARTÃO GN VITEK <sup>®</sup> 2 Compact.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S rDNA	- Gene codificador do RNA ribossomal 16S
AES	- <i>Advanced Expert System</i>
AexU	- Toxina bacteriana ribosiladora de ADP
AFA	- Ágar fosfatado alcalino
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
TCBS	- Ágar tiosulfato, citrato, bile e sacarose
Alt	- Enterotoxina citotônica termo-lábil
Ast	- Enterotoxina citotônica termo-estável
AMS	- Sistema <i>AutoMicrobic</i>
<i>aopB</i>	- gene codificador da proteína de membrana externa B
APS	- Persulfato de Amônio
AST-GN	- Cartão teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (VITEK 2)
BHI	- Caldo <i>Brain Heart Infusion</i>
Cartão GN	- Cartão de identificação de bacilos gram-negativos (VITEK 2)
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
dNTPs	- Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
GH	- Grupos de Hibridização
GNI	- Cartão de identificação de bacilos gram-negativos (VITEK)
ID-GNB	- Cartão de identificação de bacilos gram-negativos (VITEK 2)
LACEN/PR	- Laboratório Central do Estado do Paraná
LPS	- Lipopolissacarídeo
O/129	- 2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina (agente vibriostático)
PCR-RFLP	- <i>Restriction fragment length polymorphism-Polymerase chain reaction</i>
pb	- Pares de base
SAP	- Fosfatase alcalina de camarão
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
TBE	- Tampão Tris/Borato/EDTA
TSA	- <i>Tryptone Soy Agar</i>
TSB	- <i>Tryptic soy broth</i>
T3SS	- <i>Type three secretion system</i>
T6SS	- <i>Type six secretion system</i>
rpm	- Rotações por minuto
<i>rpoD</i>	- Gene codificador do fator sigma
<i>gyrB</i>	- Gene codificador da subunidade A da DNA girase
UFC/ml	- Unidades formadoras de colônia por mililitro
UV	- Ultra-violeta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
2.1 HISTÓRICO.....	14
2.2 DESCRIÇÃO DO GÊNERO.....	16
2.2.1 Taxonomia.....	16
2.2.2 Características do gênero <i>Aeromonas</i> .....	18
2.2.3 Fatores de Virulência.....	20
2.2.3.1 Adesinas.....	20
2.2.3.2 Exotoxinas.....	21
2.2.3.3 Camada-S.....	21
2.2.3.4 Cápsula.....	22
2.2.3.5 Outras características associadas com virulência.....	22
2.2.4 Susceptibilidade a antibióticos.....	23
2.2.5 Importância clínica.....	24
2.2.5.1 Gastrenterite.....	24
2.2.5.2 Infecções em ferimentos.....	25
2.2.5.3 Septicemia.....	26
2.2.5.4 Outros tipos de infecção.....	27
2.3 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA.....	27
2.4 IDENTIFICAÇÃO AUTOMATIZADA – SISTEMA VITEK.....	28
2.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	29
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
4.1 AMOSTRA.....	32
4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	34
4.2.1 Identificação Bioquímica – Método Convencional.....	34
4.2.2 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos – Método Convencional.....	35
4.2.3 Identificação bioquímica e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos – Método Automatizado.....	35
4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	36
4.3.1 Extração de DNA.....	37
4.3.2 Estimativa da concentração de DNA.....	37
4.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	37
4.3.4 Digestão do produto de PCR com endonucleases (PCR-RFLP).....	38
4.3.5 Sequenciamento de DNA.....	39
<b>5 RESULTADOS</b> .....	41
5.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	41
5.2 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA – MÉTODO CONVENCIONAL.....	43
5.3 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA – MÉTODO AUTOMATIZADO.....	45
5.4 COMPARAÇÃO ENTRE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA CONVENCIONAL E AUTOMATIZADA.....	48
5.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS – MÉTODO CONVENCIONAL.....	49

5.6	TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS – MÉTODO AUTOMATIZADO.....	50
5.7	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	51
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	56
6.1	EPIDEMIOLOGIA.....	56
6.2	IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA – MÉTODO CONVENCIONAL.....	57
6.3	IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA – MÉTODO AUTOMATIZADO.....	60
6.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (PCR-RFLP).....	64
6.5	TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS – MÉTODOS CONVENCIONAL E AUTOMATIZADO.....	65
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	69
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
	<b>APÊNDICES</b> .....	78

## 1 INTRODUÇÃO

*Aeromonas* são micro-organismos classificados no domínio *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, classe *Gamaproteobacteria*, ordem *Aeromonadales*, família *Aeromonadaceae* e gênero *Aeromonas* (PRESCOTT, 2002), sendo atualmente reconhecidas 35 espécies e subespécies (DSMZ, 2009).

O gênero *Aeromonas* compreende bacilos gram negativos anaeróbios facultativos que fermentam D-glucose, são oxidase e catalase positivos e reduzem nitrato a nitrito. Além da glucose podem utilizar vários outros carboidratos. Inclui espécies móveis (com um único flagelo polar) e imóveis, bem como bactérias mesofílicas e psicofílicas (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005). São habitantes dos ambientes aquáticos incluindo lagos, rios e água potável e são encontradas associadas com animais aquáticos. Também podem ser encontradas em ambientes marinhos, mas somente em água salobra e água com baixa concentração salina (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH 2005; HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007).

Algumas espécies de *Aeromonas* podem causar uma variedade de doenças em humanos, incluindo gastroenterites, septicemia, síndrome urêmico-hemolítica, meningites, peritonites, infecções em feridas, infecções do trato respiratório e infecções oculares. A infecção mais comumente associada com *Aeromonas* é a gastroenterite, que pode variar de uma diarreia aquosa moderada auto-limitada até uma forma mais severa, tipo disentérica invasiva similar à causada por *Shigella*. Diarreia crônica, causada por *A. hydrophila* ou *A. caviae* e excedente a um ano de duração também tem sido reportada. Diversos estudos epidemiológicos relacionaram *Aeromonas* spp. à diarreia do viajante em adultos (JANDA e ABBOTT, 1998; GALINDO *et al.*, 2006).

O isolamento de *A. hydrophila* a partir de alimentos e água e a resistência deste organismo à antibióticos e a cloração na água representa uma ameaça à saúde pública (GALINDO *et al.*, 2006).

Nos últimos 30 anos diversas metodologias foram desenvolvidas para a identificação das espécies de *Aeromonas* recuperadas de amostras clínicas, animais e ambientais. Mas freqüentemente as estirpes de *Aeromonas* spp. são confundidas com *Escherichia coli* e *Vibrio* spp. pois compartilham com este último muitas características fenotípicas (ABBOTT *et al.*, 1998; GALINDO *et al.*, 2006). Tal erro de

identificação pode levar a uma mobilização do sistema de vigilância sanitária devido ao problema de saúde pública que representa o *Vibrio cholerae*.

Uma das principais dificuldades na identificação de *Aeromonas* em nível de espécie é o elevado número de grupos taxonômicos reconhecidos. Esta dificuldade se acentuou uma vez que os estudos taxonômicos geralmente reportam apenas características bioquímicas selecionadas sobre as novas espécies descritas. Sistemas comerciais também têm sido utilizados para a identificação de *Aeromonas*, mas não se sabe quão próximos os resultados são daqueles obtidos pela metodologia convencional. Outro fator preocupante é que os esquemas bioquímicos atualmente utilizados nos laboratórios clínicos foram desenvolvidos antes da descrição de novos grupos taxonômicos (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003).

Estudos moleculares utilizando genes *housekeeping* como 16S rDNA, *rpoD* e *gyrB* tem auxiliado na identificação dessas bactérias (BORREL *et al.*, 1997; FIGUERAS *et al.*, 2000; SOLER *et al.*, 2004).

Poucos são os dados disponíveis sobre *Aeromonas* no país. No Paraná um estudo recentemente realizado no laboratório de Bacteriologia Clínica e Biologia Molecular da UFPR mostrou uma prevalência de *Aeromonas* de 2,6% entre pacientes ambulatoriais com diarreia (SUREK *et al.*, 2008). Considerando que essa prevalência é similar a de outros enteropatógenos como *Shigella* e *E. coli*, é de interesse que *Aeromonas* seja mais bem estudado visando a prevenção de casos de infecção por esse agente. O conhecimento sobre as características fenotípicas e moleculares de *Aeromonas* será importante para os estudos epidemiológicos, o que poderá auxiliar no controle e tratamento das diarreias causadas por esse micro-organismo.

Considerando a dificuldade na identificação e a sua importância como patógeno humano, neste trabalho estirpes de *Aeromonas* previamente isoladas no Paraná foram analisadas utilizando a metodologia bioquímica convencional, automatizada e PCR-RFLP do gene 16S rDNA.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO

A primeira descrição do micro-organismo hoje conhecido como *Aeromonas* foi feita por Sanarelli em 1891, que isolou este micro-organismo de sapos apresentando septicemia e foi designado *Bacillus hydrophilus fuscus*. Diversas publicações sobre este organismo ocorreram nos anos seguintes e em 1901 foi reclassificado como *Bacterium hydrophila*, uma nomenclatura que demonstrava tratar-se de um organismo relacionado a água. Devido à falta de consenso sobre esta nomenclatura, muitos pesquisadores classificaram este micro-organismo em diferentes gêneros durante os anos de 1900 a 1943, os quais incluíram *Aerobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacterium* e *Necromonas*. (FARMER III, ARDUINO e HICKMAN-BRENNER, 2006; PERCIVAL *et al.*, 2004).

A designação *Aeromonas* foi proposta em 1936 por Kluver e van Niel, na tentativa de criar um sistema de classificação baseado em características morfológicas e fisiológicas e de agrupar organismos similares numa mesma família. A denominação proposta significava literalmente “unidade produtora de gás” (PERCIVAL *et al.*, 2004). Entretanto foram necessários muitos anos para que *Aeromonas* fosse aceita como gênero. Nos 20 anos seguintes essas bactérias foram intensamente estudadas, diferenças fenotípicas foram observadas, novas estirpes foram descritas e diferentes classificações foram propostas. Somente na década de 1960 é que a definição do gênero *Aeromonas* foi estabelecida, e em 1974 houve consenso sobre a descrição de 3 espécies: *A. hydrophila*, *A. salmonicida* e *A. punctata* (FARMER III, ARDUINO e HICKMAN-BRENNER, 2006).

Na década seguinte os ensaios de hibridização indicaram que o gênero era constituído por duas linhas evolucionárias “um grupo diverso de *Aeromonas* móveis e outro, geneticamente mais homogêneo, de *Aeromonas* imóveis compreendendo a espécie *A. salmonicida*”. Mesmo na literatura mais antiga era claro o fato de que dois diferentes grupos de *Aeromonas* estavam sendo estudados. Um era composto de estirpes móveis, não produtoras de pigmento marrom difusível e que cresciam bem

a 37°C. Atualmente estas estirpes compreendem o grupo *A. hydrophila*. O outro grupo era composto de organismos imóveis, que hidrolisavam gelatina, com temperatura ótima de crescimento entre 10°C e 15°C, não sendo capazes de desenvolvimento a 37°C, e produtores de pigmento marrom em meio contendo tirosina. Atualmente estas estirpes são conhecidas como *Aeromonas salmonicida*, um importante patógeno de peixes (FARMER III, ARDUINO e HICKMAN-BRENNER, 2006).

Estudos posteriores realizados com *Aeromonas* móveis indicaram a existência de 17 grupos de hibridização, e a natureza complexa do grupo *A. hydrophila*. Foram descritas também novas espécies e verificou-se que alguns grupos definidos pela hibridização de DNA não podiam ser separados através de testes fenotípicos e que algumas espécies eram heterogêneas contendo um ou mais grupos de hibridização de DNA (MARTIN-CARNAHAN, JOSEPH, 2005; FARMER III, ARDUINO e HICKMAN-BRENNER, 2006; DEMARTA et al., 2008).

A nomenclatura e a classificação das espécies de *Aeromonas* continuaram confusas por muitos anos, mas publicações recentes têm auxiliado a definir alguns grupos (JANDA 1991; ABBOTT, CHEUNG, JANDA, 2003; FARMER III, ARDUINO e HICKMAN-BRENNER, 2006).

A aceitação do gênero *Aeromonas* como patógeno humano foi lenta. Foram necessários mais de 20 anos para se chegar à conclusão de que algumas doenças em humanos eram realmente causadas por espécies de *Aeromonas*. Em 1954, Hill e colaboradores apresentaram um estudo que comprovava a relação entre *Aeromonas* e infecção em humanos, onde sugeriram que a bactéria tinha sido o agente causador de septicemia fulminante em uma mulher que foi a óbito. Também as infecções causadas por *A. hydrophila* tornaram-se aparentes. Isto ocorreu em 1964 durante um surto de infecções registrado em um hospital em New Haven, Connecticut, EUA, onde 27 casos de infecção por *A. hydrophila* foram documentados. Um artigo sobre o surto foi publicado no periódico *New England Journal of Medicine* e representou a maior evidência, na época, da relação entre *Aeromonas* e diarreia (PERCIVAL et al., 2004).

## 2.2 DESCRIÇÃO DO GÊNERO

### 2.2.1 Taxonomia

Um dos mais frustrantes e complexos problemas envolvendo as espécies de *Aeromonas* tem sido a sua confusa taxonomia, em constante modificação (JANDA, 1991). Diversas abordagens foram aplicadas à caracterização das *Aeromonas*, mas apesar dos esforços a identificação de algumas espécies ainda é problemática pois os testes bioquímicos nem sempre são reprodutíveis e existem discrepâncias entre os grupos fenotípicos (fenoespécies) e genéticos (genomoespécies) (FIGUERAS *et al.*, 2000).

O termo “fenoespécie” refere-se a um conjunto de estirpes que possuem características fenotípicas semelhantes, agrupadas em uma espécie específica que é diferenciada das demais com base no estudo de características bioquímicas. O termo “genomoespécie” (grupo de hibridização ou GH) refere-se a estirpes com características genéticas semelhantes e, da mesma forma, constituem espécies específicas. Estas são identificadas utilizando-se a hibridização DNA-DNA, onde estirpes que apresentam aproximadamente 70% ou mais de homologia DNA-DNA e 5°C ou menos de  $\Delta T_m$  são classificadas como pertencentes a mesma espécie (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

Não há uma correspondência entre fenoespécies e genomoespécies pertencentes ao gênero *Aeromonas*. Prova disso é o caso da espécie *A. media*, pertencente ao GH 5 (Quadro 1). Descobriu-se que existiam estirpes que possuíam características genéticas semelhantes e podiam ser classificadas na genomoespécie *A. media*. Fenotipicamente, estas estirpes apresentavam características bioquímicas diferentes e podiam ser separadas, o que suscitou na divisão do GH 5 em 2 outros GHs, 5A e 5B. O GH 5A é composto por estirpes que se assemelham geneticamente com *A. media*, mas fenotipicamente com *A. caviae*, e são patógenos humanos. Entretanto, o GH 5B assemelha-se genotipicamente e fenotipicamente com *A. media*, patógenos de peixes. Sugere-se atualmente que estes dois grupos sejam considerados como duas subespécies de *A. media* ou como biovars da genomoespécie *A. media*.

Apenas cinco espécies de *Aeromonas* eram reconhecidas até meados da década de 80, três das quais, *A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae*, existiam como fenoespécies. Investigações subseqüentes resultaram no aumento do número de genomoespécies e atualmente o gênero contém 18 grupos de hibridização e 35 espécies e subespécies (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003; MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005; DSMZ, 2009).

**QUADRO 1** – GRUPOS DE HIBRIDIZAÇÃO DE DNA, MOSTRANDO AS RESPECTIVAS GENOMOESPÉCIES E FENOESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNERO *Aeromonas*.

<b>GH<sup>1</sup></b>	<b>Genomoespécies</b>	<b>Fenoespécies</b>
1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i>	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>Dhakensis</i>
	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>ranae</i>	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>Ranae</i>
2	<i>A. bestiarum</i>	tipo <i>A. hydrophila</i>
3	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>Salmonicida</i>
		<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>Achromogenes</i>
		<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>Masoucida</i>
		<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>Smithia</i>
3	Não nomeada	tipo <i>A. hydrophila</i>
4	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
5 A	<i>A. media</i>	tipo <i>A. caviae</i>
5 B	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>
6	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. eucrenophila</i>
7	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>
8 X	<i>A. veronii</i>	<i>A. sobria</i>
8 Y	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i>
9	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>
10	<i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i>	<i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i>
11	Não nomeada	<i>Aeromonas</i> spp. (Ornitina Positivo)
12	<i>A. schubertii</i>	<i>A. schubertii</i>
13	<i>Aeromonas</i> Grupo 501	tipo <i>A. schubertii</i>
14	<i>A. trota</i>	<i>A. trota</i>
15	<i>A. allosaccharophila</i>	<i>A. allosaccharophila</i>
16	<i>A. encheleia</i>	<i>A. encheleia</i>
17	<i>A. popoffii</i>	<i>A. popoffii</i>
NI <sup>2</sup>	<i>A. culicicola</i>	<i>A. culicicola</i>

FONTE: MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005; PUND e THEEGARTEN, 2008.

NOTA: 1. GH=Grupos de Hibridização 2. NI=Grupo não identificado.

### 2.2.2 Características do gênero *Aeromonas*

Os membros do gênero *Aeromonas* são bacilos gram-negativos que podem parecer como cocobacilos ou como formas filamentosas. Possuem 0.3-1.0 µm de largura por 1.0-3.5 µm de comprimento e podem ocorrer isoladamente, aos pares, ou raramente em cadeias curtas (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005). A maioria das espécies é móvel e contém um único flagelo polar, mas flagelos peritríquios podem ser formados em culturas jovens desenvolvidas em meios sólidos e flagelos laterais ocorrem em algumas espécies (KIROV *et al.*, 2002; MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005). Geralmente são oxidase e catalase positivas e resistentes a 150µg do agente vibriostático 2,4 diamino-6,7-diisopropilpteridina (O/129). São quimioorganotróficos, e apresentam metabolismo oxidativo e fermentativo da glucose. Ácido e frequentemente ácido com gás são formados a partir de muitos carboidratos, especialmente glucose, e reduzem nitrato a nitrito. Produzem uma série de enzimas tais como amilase, DNase, quitinase, elastase, esterases, peptidases, arilamidases e outras enzimas hidrolíticas (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005; HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007).

O gênero *Aeromonas* compreende bactérias capazes de crescer em uma ampla faixa de temperatura (0-45°C). As espécies mesofílicas geralmente crescem entre 10 e 42°C, mas alguns isolados podem ser mais ativos em alguns testes bioquímicos em temperaturas entre 22 a 25°C. As espécies psicrófilicas isoladas de peixes e do ambiente, *A. popoffii* e *A. salmonicida*, crescem preferencialmente entre 22 a 25°C e raramente acima de 37°C. Em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 28°C, o crescimento ocorre entre pH 4,5 a 9 e concentrações de sal entre 0 e 4%. O conteúdo de C+G é de 57 a 63% (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005; HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007).

Nos meios de cultura utilizados na rotina em laboratórios, as colônias de *Aeromonas* mesofílicas móveis apresentam de 1 – 3 mm de diâmetro, possuem aspecto liso, são circulares, convexas, translúcidas, e de coloração branco-acinzentado, após 24-48 horas de incubação à 35°C. Colônias envelhecidas podem desenvolver uma coloração esverdeada, similar as observadas em certas espécies de *Vibrio*, e odor pronunciado. Pode haver variação no tamanho da colônia em algumas ocasiões, tanto no isolado original ou após subcultura. As estirpes de *A.*

*media* podem produzir um pigmento marrom difusível no ágar tripticase soja (TSA). As colônias de *A. salmonicida* são puntiformes após 18-24 horas de incubação à 20-22°C, mas após 4 dias de incubação tornam-se circulares, convexas e com 1-2 mm em diâmetro. Muitas subespécies de *A. salmonicida* produzem um pigmento marrom difusível após 5 dias, especialmente em meio contendo tirosina. A presença de cápsula, visível entre muitas destas espécies, resulta no aparecimento de colônias com aspecto brilhante à mucóide.

No ágar MacConkey, a maioria das espécies mesofílicas crescem como não fermentadores de lactose, mas alguns isolados de *A. caviae* podem utilizar este carboidrato. Isto pode causar confusão na determinação de coliformes em fontes de água, os quais também são fermentadores de lactose (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

Isolados clínicos geralmente são incubados a 37°C, e isolados ambientais a 22-30°C. *Aeromonas* são freqüentemente confundidas com *Escherichia coli* e *Vibrio* spp., sendo a identificação errônea um problema contínuo (GALINDO *et al.*, 2006), pois compartilha com este último muitas características fenotípicas. Tal erro de identificação pode imediatamente levar a uma mobilização do sistema de saúde pública devido ao problema que representa o *V. cholerae*. Para evitar tal erro, reações-chave de classificação devem ser utilizadas como, por exemplo, detecção de crescimento em caldo nutriente na presença e na ausência de NaCl, resistência ao agente vibriostático O/129, e crescimento em ágar TCBS (tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose) (ABBOTT *et al.*, 1998).

Essas bactérias são universalmente distribuídas, sendo ubíquas nos ambientes aquáticos incluindo lagos, rios, esgoto doméstico e água potável, podendo também serem encontradas em ambientes marinhos com baixa concentração de sal (KÜHN *et al.*, 1997; SEN e RODGERS, 2004; GALINDO *et al.*, 2006). São amplamente isoladas de amostras clínicas, ambientais e alimentícias, onde podem se desenvolver até mesmo em baixas temperaturas e produzir toxinas, o que aumenta significativamente o risco de intoxicação alimentar (CHOPRA e HOUSTON, 1999; GALINDO *et al.*, 2006).

### 2.2.3 Fatores de Virulência

Fatores de virulência são características que permitem a uma bactéria colonizar, invadir, evitar o sistema de defesa e causar dano tecidual ao hospedeiro. Bactérias do gênero *Aeromonas* spp. produzem uma vasta gama de fatores de virulência tais como proteases, hemolisinas, citotoxinas, enterotoxinas, leucocidina, elastases e adesinas (CHOPRA e HOUSTON, 1999; JOSEPH e CARNAHAN, 2000; CASCÓN et al., 2000; GALINDO et al., 2006; VON GRAEVENITZ, 2007), mas os mecanismos associados à doença não foram ainda claramente estabelecidos (HUYS et al., 2002).

#### 2.2.3.1 Adesinas

A aderência bacteriana às células do hospedeiro desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da infecção sendo geralmente mediada por macromoléculas designadas adesinas. Localizam-se na superfície das bactérias e são capazes de promover ligação a um receptor específico. A maioria das bactérias expressa mais do que um tipo de adesina (SALYERS e WHITT, 2002).

Diversas adesinas filamentosas (fímbrias) e não-filamentosas (adesinas afimbriais) tem sido descritas em espécies de *Aeromonas* mesofílicas. Estruturas filamentosas incluem vários tipos de fímbrias, entre elas as fímbrias curtas e rígidas (C/R) as quais estão presentes em grande número na célula bacteriana e são observadas em isolados clínicos e ambientais, e fímbrias longas e flexíveis (L/F) presentes em menor número e também observadas em isolados clínicos e ambientais. Ambos os tipos de fímbrias atuam aumentando a adesão de espécies de *Aeromonas* mesofílicas à diferentes linhagens celulares (MERINO et al., 1995). Nos últimos anos vários genes associados com a expressão de adesinas em *Aeromonas* começaram a ser identificados, e estudos moleculares tem ajudado a esclarecer o papel destas estruturas na patogenicidade (JOSEPH e CARNAHAN, 2000; FANG et al., 2004).

### 2.2.3.2 Exotoxinas

Há dois principais grupos de exotoxinas descritas em *Aeromonas*. O primeiro grupo é o das citotoxinas e inclui as aerolisinas, fosfolipases e hemolisinas. O papel destas na patogenicidade parece ser importante, pois mutantes incapazes de produzir ou de secretar as exotoxinas mostram uma redução na patogenicidade (MERINO *et al.*, 1995; WONG, HEUZENROEDER e FLOWER, 1998).

O segundo grupo inclui as enterotoxinas citotônica e citotóxica, que foram identificadas em filtrados de culturas de *Aeromonas*. A enterotoxina citotóxica Act provoca extensiva lesão do epitélio intestinal. É um dos mais potentes fatores de virulência de *Aeromonas*, é termo-lábil e possui atividades hemolítica, citotóxica e enterotóxica (XU *et al.*, 1998; CHOPRA e HOUSTON, 1999; VON GRAEVENITZ, 2007). A inativação do gene *act*, que codifica a toxina Act, resulta em drástica redução da virulência, (SHA, KOZLOVA e CHOPRA, 2002).

As enterotoxinas citotônicas Alt – termo-lábil, e Ast – termoestável, provocam a secreção de fluidos, mas não a degeneração das criptas e vilosidades do intestino. Alt e Ast podem atuar sinergicamente provocando diarreia severa (CHOPRA e HOUSTON, 1999; ALBERT *et al.*, 2000; VON GRAEVENITZ, 2007).

### 2.2.3.3 Camada-S

Uma característica associada com a virulência em *Aeromonas* é a capacidade de produzir camada-S, uma estrutura composta de subunidades idênticas de proteínas que são translocadas para a membrana externa da célula e ancoradas à mesma através de ligações com o lipopolissacarídeo (LPS). A camada-S confere à bactéria a capacidade de se ligar a estruturas do hospedeiro tais como fibronectina, laminina, vitronectina, claramente aumentando a capacidade de adesão destas células e isso se reflete no aumento da colonização das mucosas do intestino. Também confere resistência ao soro, menor susceptibilidade à fagocitose e à digestão por proteases. A perda da capacidade de produzir a camada-S reduz a virulência de *Aeromonas* (MERINO *et al.*, 1995; NOONAN e TRUST, 1997).

#### 2.2.3.4 Cápsula

A presença de cápsula polissacarídica é uma característica comum em muitas bactérias. Esta estrutura desempenha uma função importante na proteção da célula contra o dessecamento e nas interações patógeno-hospedeiro na defesa contra a fagocitose, sistema complemento, além de atuar também na adesão (SALYERS e WHITT, 2002).

*A. salmonicida* é capaz de produzir um polissacarídeo capsular quando é cultivada em meio rico em glucose e também *in vivo*. *Aeromonas* spp. mesofílicas pertencentes aos sorotipos O:11 e O:34 (dois dos mais freqüentes sorotipos de isolados clínicos em todo o mundo), que compreendem *A. hydrophila* e *A. veronii* biovar sobria também mostram a mesma habilidade de produzir polissacarídeo capsular quando cultivadas em meio rico em glucose. A presença deste aumenta a adesão a diferentes superfícies, previne fagocitose, e é um fator que aumenta a virulência destas bactérias (MERINO *et al.*, 1995; AGUILAR *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2005).

#### 2.2.3.5 Outras características associadas com virulência

A presença de um sistema de secreção tipo III (T3SS) e ilhas genômicas (YU *et al.*, 2004, 2005) já foi descrita em *Aeromonas*. A presença de T3SS é considerada uma característica de virulência que se correlaciona com a patogenicidade bacteriana, e pode ser usada como um indicador de virulência. A importância do T3SS para a patogenicidade de *A. hydrophila* foi demonstrada pelo aumento do número de camundongos que sobreviveram à injeção intraperitoneal de mutantes *aopB*, que codifica a proteína de membrana externa B envolvida na formação do T3SS (SHA *et al.*, 2007). Uma proteína efetora secretada pelo T3SS, AexU, também parece ser importante para a virulência. Apresenta atividade de ADP-ribosilação de proteínas da célula hospedeira e provoca reorganização da actina alterando a morfologia celular e provocando morte celular via apoptose, além disso, camundongos infectados com mutantes *aexU* apresentam maior taxa de

sobrevivência em relação àqueles infectados com a estirpe selvagem (SHA et al., 2007).

Recentemente SUAREZ *et al.*, 2008 descreveram um sistema de secreção tipo VI (T6SS), também denominado “virulence-associated secretion” em *A. hydrophila*. Este sistema foi inicialmente descrito em *V. cholerae* e secreta proteínas que não contém seqüências sinal sec-dependente. A participação desse sistema na virulência de *Aeromonas* foi demonstrada através da deleção de genes essenciais para a síntese e/ou que compõem o T6SS, causando redução da virulência para camundongos.

Esses dados sugerem que a virulência em *Aeromonas* é um processo complexo e envolve múltiplos fatores que atuam em conjunto.

#### 2.2.4 Susceptibilidade a antibióticos

Antibióticos são substâncias naturais ou sintéticas que inibem o crescimento bacteriano. Atualmente estão disponíveis comercialmente vários tipos de antibióticos que agem em diferentes componentes estruturais ou bioquímicos das bactérias, entretanto a eficácia desses compostos tem sido desafiada pelo crescente desenvolvimento da resistência bacteriana (LERNER e LERNER, 2003).

A maior parte das espécies de *Aeromonas* móveis geralmente apresenta resistência a ampicilina (exceto *A. trota* 100% suscetível, e *A. caviae* 35% suscetível). Apresentam comportamento variável frente a ticarcilina e piperacilina (exceto *A. veronii* biovar *veronii* 100% resistente, e *A. trota* 100% suscetível), cefalotina, cefazolina, cefoxitina (exceto *A. veronii* biovar *veronii* 100% suscetível), cefuroxime, ceftriaxona e cefotaxima. São suscetíveis à ciprofloxacina, gentamicina, amicacina e tobramicina (*A. veronii* biovar *veronii* 42% resistente), imipenem (*A. jandaei* 65% resistente e *A. veronii* biovar *veronii* 67% resistente) e sulfametoxazol-trimetoprim (HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007). Entretanto, casos de resistência a ciprofloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, cloranfenicol, tetraciclina, aminoglicosídeos e sulfametoxazol-trimetoprim já foram descritos (VILA *et al.*, 2002, 2003; SINHA *et al.*, 2004; NEUWIRTH *et al.*, 2007).

Muitas espécies produzem  $\beta$ -lactamases cromossomais induzíveis, e no mínimo três tipos distintos dessas enzimas já foram encontrados em *Aeromonas* incluindo uma cefalosporinase da classe C, uma penicilinase do grupo 2d, e carbapenemase do grupo 3 (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005; HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007), além de  $\beta$ -lactamases de origem plasmidial (NEUWIRTH *et al.*, 2007; LIBISCH *et al.*, 2008). A presença dessas  $\beta$ -lactamases, em particular a carbapenemase, pode não ser detectada pelo antibiograma convencional, requerendo testes especiais.

A realização de testes de suscetibilidade a antimicrobianos de isolados locais é necessária para detectar padrões relacionados às espécies, tais como a contínua susceptibilidade de *A. veronii* biovar sobria, e porque a susceptibilidade pode variar de uma região geográfica a outra (HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007).

#### 2.2.5 Importância clínica

Entre as espécies de *Aeromonas* spp., atualmente *A. hydrophila*, *A. caviae*, e *A. veronii* biovar sobria são as mais comumente associadas com infecções em humanos e somam mais de 85% dos isolados clínicos pertencentes a esse gênero (JANDA e ABBOTT, 1998; VILA *et al.*, 2003; AL-BENWAN *et al.*, 2007; TSAI *et al.*, 2009).

##### 2.2.5.1 Gastrenterite

A associação de *Aeromonas* spp. como causa de diarreia vem da década de 60, quando a primeira estirpe foi isolada de fezes humanas. Posteriormente essas bactérias foram implicadas em diversos surtos associados com o consumo de alimentos contaminados, e com diarreia do viajante (JANDA e ABBOTT, 1998; CHOPRA e HOUSTON, 1999; VILA *et al.*, 2003).

Em humanos, a doença mais comumente associada com *Aeromonas* spp. é a gastrenterite, a qual abrange desde uma diarreia aquosa moderada auto-limitada

até uma forma mais severa, tipo disentérica invasiva similar a causada por *Shigella*. Diarréia crônica, causada por *A. hydrophila* ou *A. caviae* e excedente a um ano de duração também foi reportada. *Aeromonas* spp. também é uma causa da diarréia do viajante em adultos (DEODHAR, SARASWATHI e VARUDKAR, 1991; KÜHN *et al.*, 1997; ALBERT *et al.*, 2000; VILA *et al.*, 2003; GUERRA *et al.*, 2007; KHAN *et al.*, 2008; SUREK *et al.*, 2008).

A gastroenterite causada por *Aeromonas* spp. na população pediátrica é particularmente problemática, com 2-20% das crianças na população mundial sofrendo de diarréia provocada apenas por espécies de *Aeromonas*. Apenas 0-2% das crianças infectadas por *Aeromonas* não apresentam sintomas de diarréia (GALINDO *et al.*, 2006).

#### 2.2.5.2 Infecções em ferimentos

Infecções em ferimentos são a segunda maior fonte de isolados clínicos de *Aeromonas* spp., sendo a maioria causada por *A. hydrophila*. Do mesmo modo que a gastroenterite, os sintomas clínicos associados com infecções em ferimentos causadas por *Aeromonas* variam de pessoa a pessoa, dependendo do estado imune do hospedeiro, e abrangem infecções superficiais moderadas (por exemplo, celulite) a infecções profundas mais sérias como ectima gangrenosa e mionecrose, que envolvem fáscia, tendões, músculos, ossos e juntas. A maior parte (82%) dos ferimentos infeccionados atribuídos à *Aeromonas* spp. envolve a entrada da bactéria em indivíduos saudáveis através de abrasões ou cortes, freqüentemente (43%) em associação com exposição recreacional ou ocupacional a ambientes aquáticos contaminados com a bactéria. Surpreendentemente, virtualmente todos os casos de ferimentos em infecções causadas por contato com ambientes aquáticos contaminados com *Aeromonas* spp. aconteceram em água potável, apesar do fato de que estes micro-organismos podem ser recuperados da água salgada e frutos do mar e que a densidade bacteriana em ambientes marinhos ( $\sim 10^2$  UFC/ml) é semelhante a dos habitats de água doce (GALINDO *et al.*, 2006).

O solo contaminado é também outra fonte para a infecção de ferimentos, perfazendo um terço das infecções nos pés associados com *Aeromonas*. O solo (ou

objetos inanimados recobertos com solo contaminado) também é a fonte predominante de ferimentos infectados por *Aeromonas* causados secundariamente a trauma severo. Danos relacionados à esmagamentos, queimaduras severas e/ou fraturas combinadas, que acontecem em ambientes infestados com a bactéria podem levar a grave infecção destes ferimentos, incluindo mionecrose, gangrena gasosa sinérgica ou infecções ósseas (JANDA e ABBOTT, 1998; GALINDO *et al.*, 2006; TENA *et al.*, 2007; TAO *et al.*, 2009).

Mesmo sendo menos comum do que as infecções em feridas adquiridas do ambiente, as infecções nosocomiais associadas com *Aeromonas* também tem sido reportadas, as quais são tipicamente causadas pela transferência da bactéria de áreas infectadas para tecidos estéreis através de intervenções médicas, tais como cirurgias. Raramente infecções em ferimentos por *Aeromonas* se desenvolvem em pessoas que não sofreram trauma e não possuem qualquer doença subjacente (GALINDO *et al.*, 2006).

#### 2.2.5.3 Septicemia

Septicemia causada por *Aeromonas* spp. ocorre mais comumente em adultos imunocomprometidos ou crianças abaixo de 2 anos de idade, e também associada a malignidades (40-50%), doença hepatobiliar (15-30%) ou diabetes (3-5%). Também está associada a outras doenças subjacentes que incluem pancreatite, trauma, anomalias cardíacas, distúrbios gastrintestinais, anemia e problemas respiratórios. A septicemia geralmente apresenta uma taxa de mortalidade de 25-50%. A taxa de mortalidade é particularmente alta para indivíduos que desenvolvem septicemia associada com mionecrose exógena (>90%) ou subsequente a queimadura severa (~67%). Só raramente a septicemia associada a *Aeromonas* spp. tem sido descrita em indivíduos saudáveis sem exposição à fontes de água doce contaminadas com a bactéria (GALINDO *et al.*, 2006; TENA *et al.*, 2007; TSAI *et al.*, 2009).

#### 2.2.5.4 Outros tipos de infecção

*Aeromonas* spp. podem causar uma variedade de outras infecções, incluindo síndrome urêmica-hemolítica, fascite necrotizante, meningites, peritonites, doenças do trato respiratório, cistite e infecções oculares (GALINDO *et al.*, 2006; TENA *et al.*, 2007; AL-BENWAN *et al.*, 2007).

### 2.3 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

Uma das principais dificuldades na identificação de *Aeromonas* ao nível de espécie é devida ao elevado número de grupos taxonômicos e ao fato de que apenas características bioquímicas selecionadas sobre as novas espécies descritas geralmente são apresentadas. Além disso, mesmo que os testes utilizados sejam os mesmos em cada estudo, as condições de crescimento, composição do meio de cultura, procedimento de inoculação e condições de incubação podem variar consideravelmente, afetando potencialmente os resultados. Em alguns estudos foram utilizados sistemas comerciais de identificação bioquímica, e não está claro o quão próximo esses resultados são daqueles que utilizam metodologia convencional. Além disso, muitos dos esquemas bioquímicos atualmente utilizados nos laboratórios clínicos para a identificação de *Aeromonas* spp. são anteriores a descrição de novos grupos taxonômicos. E a diversidade nas metodologias tem dificultado o desenvolvimento de esquemas de tipagem e propriedades fenotípicas consistentes para identificar a maioria das estirpes de *Aeromonas* ao nível de espécie no laboratório clínico (JANDA e ABBOTT, 1998; ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003).

Em um estudo onde 428 estirpes de *Aeromonas* foram analisadas utilizando 63 testes fenotípicos, apenas 4 dos testes bioquímicos forneceram reações uniformes: a fermentação de D-glucose, produção de nitrato redutase, e falha na produção de ácido a partir de dulcitol e eritritol, documentando a extensiva diversidade fenotípica neste gênero e nas espécies então reconhecidas. Isto dificulta a identificação de isolados de *Aeromonas* ao nível de espécie sem a utilização de

um grande número de testes bioquímicos (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003). Felizmente, cerca de 85% dos isolados clínicos humanos são pertencentes a três espécies, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar sobria (GALINDO *et al.*, 2006).

## 2.4 IDENTIFICAÇÃO AUTOMATIZADA – SISTEMA VITEK

O uso de sistemas automatizados está em expansão nos laboratórios de microbiologia clínica, e os microbiologistas dependem da precisão destes para uma correta identificação dos isolados. Recomenda-se que a precisão de um sistema automatizado exceda 90% na sua habilidade em identificar micro-organismos do ambiente clínico e que este seja capaz de identificar organismos comumente isolados com no mínimo 95% de precisão comparada com as precisões de métodos convencionais (O'HARA, 2006).

O Sistema Vitek é amplamente utilizado na atualidade (O'HARA *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2003; NAKASONE *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008; DELMAS *et al.*, 2008). A primeira versão desse sistema de identificação bacteriana automatizado surgiu nos primórdios da corrida espacial quando a *McDonnell Douglas Astronautics Co. Bioscience Laboratory* introduziu o conceito de detecção, enumeração e identificação de micro-organismos no ambiente de uma espaçonave. Empregava cartões plásticos contendo substratos liofilizados para a identificação microbiana e um sistema ótico para a detecção microbiana associado a um computador para controle e processamento. Surgiu então, em 1973, o Sistema AutoMicrobic (AMS) (MacDonnell Douglas Corp., St. Louis, Mo.). Pouco depois, o AMS foi reconfigurado para identificar *Enterobacteriaceae* de amostras clínicas, e mostrou uma precisão de 97,8% para 1.020 isolados comparados aos testes bioquímicos convencionais. O tempo necessário para a identificação bacteriana era cerca de 8 horas. O AMS tornou-se comumente conhecido como Vitek. Em 1982, foi desenvolvido um novo cartão que permitiu identificar vários organismos não-entéricos e reduziu o tempo de processamento para 4 horas em muitos casos. Em 1988, o Sistema Vitek, Inc., foi comprado pela bioMérieux, Inc. e novos melhoramentos foram feitos aumentando o número de organismos reconhecidos no banco de dados, melhorando a precisão da identificação ao mesmo tempo em que diminuía o tempo de liberação dos resultados

de 5.7 para 4.1 horas. Em 1997, a bioMérieux introduziu a nova geração do equipamento, o Vitek 2, e o cartão ID-GNB (O'HARA, 2005). Esse sistema tem tecnologia baseada em fluorescência e é mais sensível na detecção de alterações metabólicas, fornecendo identificação de micro-organismos em tempo aproximado de 3 horas (citado em FUNKE *et al.*, 1998). O ano de 2004 presenciou o advento do VITEK<sup>®</sup> 2 Compact. Este sistema utiliza a tecnologia "Advanced colorimetry", conta com a adição de novos substratos em relação às versões anteriores e um banco de dados mais amplo (O'HARA, 2005; NAKASONE *et al.*, 2007; [www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt)).

## 2.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A identificação de *Aeromonas* spp. há muito tempo tem gerado controvérsias devido a sua heterogeneidade fenotípica, descrição e reclassificação de novas espécies que resultaram em mudanças na taxonomia do gênero.

O gene codificador do RNA ribossomal 16S (ou 16S rDNA) provou ser uma ferramenta valiosa ao fornecer seqüências características para o delineamento e identificação da maior parte das espécies de *Aeromonas*. Conseqüentemente, diversos oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos foram descritos na literatura. Um protocolo baseado nos padrões de PCR-RFLP do produto de amplificação por PCR do gene 16S rDNA permitiu a identificação da maior parte das espécies de *Aeromonas* spp. com o uso de duas endonucleases de restrição simultaneamente, a *AluI* e a *MboI* (BORRELL *et al.*, 1997 e FIGUERAS *et al.*, 2000). A aplicação de tal metodologia pode facilitar a identificação desse grupo de bactérias.

Além desse, outros protocolos de PCR-RFLP tem sido descritos para a identificação molecular de *Aeromonas*, como os descritos por GRAF, 1999 e GHATAK, AGARWAL e BHILEGAONKAR, 2007. Mas existem controvérsias sobre a sua utilidade na discriminação das espécies de *Aeromonas*. O protocolo proposto por Graf é uma variação daquele proposto por BORRELL *et al.*, 1997 e FIGUERAS *et al.*, 2000. Amplifica apenas uma região de 600pb do gene 16S rDNA, e utiliza 3 enzimas (*AluI*, *CfoI* e *MnI*) para a digestão do fragmento. Além disso, padrões não discriminatórios são obtidos para algumas espécies (FIGUERAS *et al.*, 2000).

O protocolo de GHATAK, AGARWAL e BHILEGAONKAR, 2007 utiliza os oligonucleotídeos iniciadores descritos por BORRELL *et al.*, 1997, amplificando o gene 16S rDNA completo. Entretanto envolve até 4 digestões seqüenciais independentes com as enzimas *Bst*SNI, *Mbol*, *Pvu*II e *Nru*I para diferenciar somente um número limitado de espécies de *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* biovars sobria e veronii e *A. jandaei*). Além da discriminação limitada, outro problema desse método é que os padrões descritos para essas espécies podem ser compartilhados com outras *Aeromonas* spp (FIGUERAS, ALPERI e GUARRO, 2007).

AOYAGY *et al.*, 2009 utilizaram a técnica de Nested-PCR para identificar a presença de *A. sobria* em casos de morte por afogamento, através da pesquisa do gene da aerolisina. Já TRAKHNA *et al.*, 2009 desenvolveram um ensaio de PCR em tempo real para a detecção de *A. hydrophila* em amostras clínicas e ambientais, utilizando para isso primers e sondas específicas para análise dos genes 16S rRNA e *aerA* (enterotoxina citolítica), mostrando grande poder discriminatório para detecção desta espécie.

SZCZUKA e KAZNOWSKI, 2004 compararam as técnicas de RAPD, REP-PCR e ERIC-PCR na análise de clones de *Aeromonas* isoladas de amostras clínicas e ambientais. Observaram que os métodos de RAPD e ERIC-PCR possuíam o mesmo poder discriminatório e provaram ser ferramentas uteis em investigações epidemiológicas e análise genética populacional, enquanto que a técnica de REP-PCR mostrou-se menos efetiva na diferenciação dos isolados de *Aeromonas* spp.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar fenotípica e molecularmente estirpes de *Aeromonas* isoladas de infecções em humanos no estado do Paraná.

#### 3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Determinar o perfil bioquímico complementar das estirpes de *Aeromonas* spp utilizando métodos microbiológicos convencionais.

3.2.2 Identificar o perfil bioquímico das estirpes de *Aeromonas* spp utilizando o sistema de identificação microbiológica automatizado VITEK<sup>®</sup> 2 Compact.

3.2.3 Comparar os resultados da identificação convencional e automatizada.

3.2.4 Determinar o padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados.

3.2.5 Realizar a identificação molecular das espécies de *Aeromonas* através do método da Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (PCR-RFLP) do gene 16S rDNA.

3.2.6 Comparar os resultados da identificação bioquímica e molecular.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

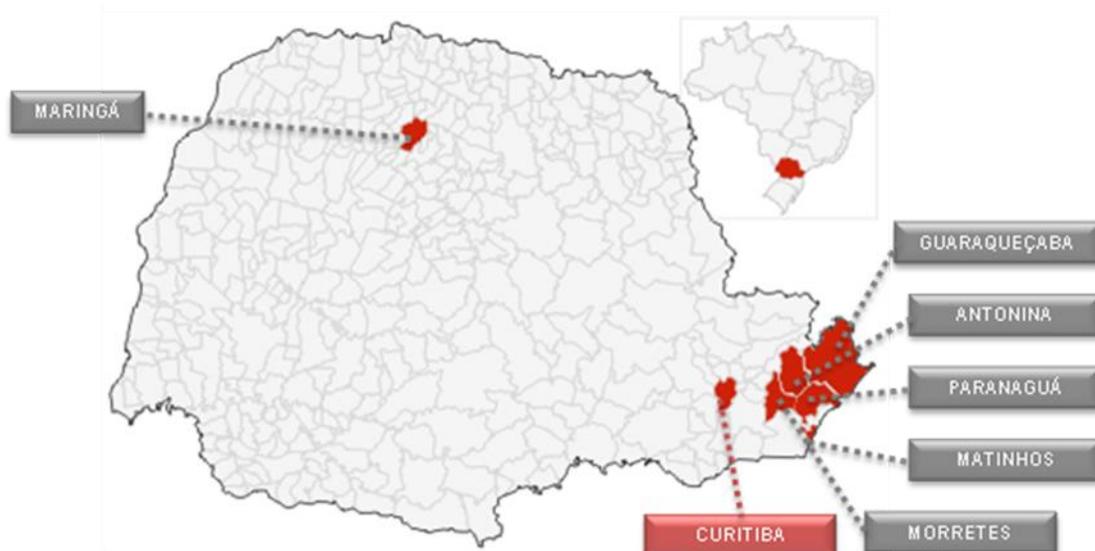
### 4.1 AMOSTRA

Foram analisadas 74 estirpes de *Aeromonas* spp. previamente isoladas de pessoas com diarreia (n=73) e bacteremia (n=1) no Estado do Paraná durante os anos de 1999 a 2009.

Cinquenta e cinco destas bactérias foram isoladas no Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR) no período de 1999 a 2009, e mantidas em ágar fosfatado alcalino (AFA) à temperatura ambiente.

No Laboratório de Bacteriologia Clínica da UFPR, SUREK *et al.*,2008 isolou 19 estirpes no período de 2007 a 2008, essas bactérias foram mantidas em meio Cary-Blair (4-8°C). Dados epidemiológicos referentes a esses isolados são ilustrados na Figura 1 e indicados no Quadro 2.

**FIGURA 1** - MAPA DO ESTADO DO PARANÁ, DESTACANDO AS LOCALIDADES DE ORIGEM DAS AMOSTRAS DE *Aeromonas* ANALISADAS.



FONTE: adaptado de WIKIMEDIA COMMONS

<[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Curitiba\\_Parana\\_Brazil.gif](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Curitiba_Parana_Brazil.gif)>

NOTA: em destaque a cidade de Curitiba, Capital do Estado do Paraná.

**QUADRO 2 - DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS AMOSTRAS ANALISADAS.**

Amostra <sup>1</sup>	Local <sup>2</sup>	Idade <sup>3</sup>	Sexo	Data <sup>4</sup>	Amostra <sup>1</sup>	Local <sup>2</sup>	Idade <sup>3</sup>	Sexo	Data <sup>4</sup>
LACEN-01	Gqba	21	M	22/02/2000	LACEN-56	Pguá	41	F	14/10/2003
LACEN-02	Pguá	27	F	22/02/2000	LACEN-59	Pguá	1	M	09/03/2004
LACEN-04	Pguá	69	M	29/11/2000	LACEN-60	Pguá	36	F	18/08/2005
LACEN-06	Mrts	4	F	20/12/2001	LACEN-61	Ctba	NI	M	07/10/2005
LACEN-07	Pguá	36	M	26/12/2001	LACEN-62	Gqba	65	F	17/05/2006
LACEN-08	Pguá	77	F	24/01/2001	LACEN-63	Ctba	24	F	05/10/2006
LACEN-09	Pguá	66	M	26/01/2001	LACEN-64	Ctba	17	M	09/10/2006
LACEN-10	Pguá	33	M	14/02/2001	LACEN-66	Ctba	20	M	24/10/2006
LACEN-11	Pguá	4	M	14/02/2001	LACEN-67	Ctba	46	F	18/12/2006
LACEN-14	NI	33	M	15/03/2001	LACEN-68	Ctba	38	F	17/01/2007
LACEN-18	Ant	30	F	06/12/2001	LACEN-69	NI	1	F	26/04/2007
LACEN-19	Ant	13	F	07/12/2001	LACEN-70	Ctba	35	F	22/01/2008
LACEN-20	Ant	43	F	07/12/2001	LACEN-71	Ctba	8	F	28/03/2008
LACEN-22	Mthos	5m	F	06/02/2002	LACEN-72	Ctba	2	F	31/03/2008
LACEN-23	Mthos	06m	M	21/03/2002	LACEN-73	Pguá	39	F	19/05/2008
LACEN-25	Pguá	19	F	21/03/2002	LACEN-74	Ctba	10	M	19/05/2008
LACEN-26	Pguá	63	F	21/03/2002	MS-75	Ctba	44	M	28/11/2007
LACEN-29	Mthos	02m	M	08/04/2002	MS-76	Ctba	6	F	20/09/2007
LACEN-31	Pguá	NI	M	22/04/2002	MS-77	Ctba	2	M	31/01/2008
LACEN-32	Pguá	28	M	03/06/2002	MS-78	Ctba	4	F	14/12/2007
LACEN-35	Mthos	16	M	17/06/2002	MS-79	Ctba	82	M	07/12/2007
LACEN-36	Mthos	40	M	17/06/2002	MS-80	Ctba	2	M	13/09/2007
LACEN-37	Mthos	16	M	17/06/2002	MS-81	Ctba	26	M	17/08/2007
LACEN-38	Mthos	17	M	17/06/2002	MS-82	Ctba	9	M	22/01/2008
LACEN-39	Mthos	42	M	17/06/2002	MS-83	Ctba	4	M	22/02/2008
LACEN-40	Mthos	15	M	17/06/2002	MS-84	Ctba	NI	NI	2007
LACEN-42	Pguá	23	F	24/10/2002	MS-85	Ctba	8	F	24/01/2008
LACEN-43	Pguá	51	M	03/12/2002	MS-86	Ctba	1	NI	04/05/2007
LACEN-44	Pguá	20	M	21/01/2003	MS-87	Ctba	43	F	10/09/2007
LACEN-45	Pguá	26	M	03/02/2003	MS-88	Ctba	41	F	05/09/2007
LACEN-46	Pguá	14	F	30/04/2003	MS-89	Ctba	1	F	16/02/2008
LACEN-47	Pguá	9	M	05/05/2003	MS-90	Ctba	66	M	29/11/2007
LACEN-49	Pguá	2	M	29/04/2003	MS-91	Ctba	33	NI	04/05/2007
LACEN-50	Pguá	60	M	14/05/2003	MS-92	Ctba	55	F	25/02/2008
LACEN-51	Mrts	08m	F	30/06/2003	MS-93	Ctba	1	F	20/12/2007
LACEN-53	Pguá	2	M	20/08/2003	LACEN-94	NI	NI	NI	1999
LACEN-55	Pguá	16	M	01/10/2003	LACEN-95 <sup>5</sup>	Mngá	47	F	14/01/2009

NOTA: 1. LACEN – amostras isoladas pelo Laboratório de Bacteriologia Geral do LACEN-PR; MS – amostras isoladas por SUREK *et al.*, 2008 no Laboratório de Bacteriologia Clínica da UFPR. 2. Localidades: Ant - Antonina/PR, Ctba – Curitiba/PR, Gqba - Guaraqueçaba/PR, Mthos – Matinhos/PR, Pguá – Paranaguá/PR, Mngá – Maringá/PR, Mrts – Morretes/PR 3. Idade dos pacientes expressa em anos. 4. Data de isolamento das amostras 5. Amostra isolada no sangue. NI: Dados não informados, M: Masculino, F: Feminino.

## 4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

A reativação das estirpes de *Aeromonas* foi realizada em ágar Triptona de Soja (TSA). Uma alíquota dos estoques bacterianos foi transferida para o TSA e incubada a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica. Após esse período várias colônias isoladas de cada cultura foram selecionadas e re-incubadas da mesma forma.

As culturas foram então analisadas quanto à morfologia colonial e pureza. Uma colônia isolada de cada cultura foi analisada microscopicamente pelo Gram, para confirmar a morfologia e reação tintorial características de *Aeromonas*, e também quanto à atividade de citocromo oxidase. As culturas caracterizadas pela presença de bacilos gram negativos citocromo oxidase positivos foram utilizadas para o preparo de novos estoques em Cary-Blair e TSB/glicerol 20% e mantidas respectivamente a temperatura ambiente e a -20°C. Essas culturas foram então analisadas conforme descrito a seguir.

### 4.2.1 Identificação Bioquímica- Método convencional

As estirpes de *Aeromonas* spp. foram analisadas utilizando 28 testes bioquímicos, descritos para a caracterização deste grupo de bactérias, selecionados entre os 63 testes utilizados por ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003.

Os seguintes testes foram realizados: produção de indol, H<sub>2</sub>S, urease, motilidade, utilização de arginina, lisina e ornitina, teste de halofilia em caldo nutriente acrescido de 0, 1, 3, 6, 8 e 10% de NaCl, Voges-Proskauer, esculina, fermentação de D-glucose, L-arabinose, m-inositol, lactose, D-manitol, manose, L-ramnose, sacarose, salicina, D-sorbitol, celbiose, maltose, citrato de Simmons, suscetibilidade ao agente vibriostático O/129 150 µg, produção de β-hemólise e produção de gás a partir da glucose. Além desses testes, foi verificada a suscetibilidade aos antibióticos ampicilina e cefalotina, juntamente com o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Estes dois antibióticos são utilizados como

marcadores para definir algumas espécies de *Aeromonas*, com base na resistência intrínseca apresentada por algumas estirpes.

#### 4.2.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos – Método convencional

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado através da técnica de disco-difusão, de acordo com o preconizado pelo documento M45-P (CLSI, 2006) para micro-organismos de isolamento raro.

Os discos de antibióticos (Oxoid) utilizados foram ácido nalidixico (30µg), amicacina (30µg), amoxicilina-ácido clavulânico (20µg/10µg), ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), cefepima (30µg), cefoxitina (30µg), ceftazidima (30µg), ceftriaxona (30µg), ciprofloxacino (5µg), cloranfenicol (30µg), imipenem (10µg), levofloxacino (5µg), meropenem (10µg), nitrofurantoína (300µg), sulfametoxazol-trimetoprima (1,25µg/23,75µg) e tetraciclina (30µg).

A interpretação dos halos de inibição foi realizada de forma manual com auxílio de régua milimetrada e/ou utilizando o Sistema Osiris™ (Bio-Rad) para registro dos diâmetros de inibição (Apêndice 1).

#### 4.2.3 Identificação bioquímica e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos – Método Automatizado

A identificação bacteriana e o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos automatizados foram realizados utilizando o equipamento VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Inc.), de acordo com as instruções do fabricante, ou com modificações descritas a seguir.

Para a identificação das estirpes foi empregado o cartão GN (cartão para identificação de bacilos gram-negativos) que contém os substratos liofilizados referentes a 47 provas bioquímicas. Os seguintes testes são realizados neste cartão: Ala-Fe-Pro Arilamidase, Adonitol, L-Pirrolidonil-Arilamidase, L-Arabitól, D-Celobiose, Beta-galactosidase, Produção de H<sub>2</sub>S, Beta-N-acetil-glucosaminidase, Glutamil Arilamidase pNA, D-Glucose, Gama-glutamyl-transferase, Fermentação/glucose,

Beta-Glucosidase, D-Maltose, D-Manitol, D-Manose, Beta-Xilosidase, Beta-Alanina arilamidase pNA, L-Prolina Arilamidase, Lipase, Palatinose, Tirosina Arilamidase, Urease, D-Sorbitol, Sacarose, D-Tagatose, D-Trealose, Citrato (Sódio), Malonato, 5-ceto-D-Gluconato, Alcalinização L-Lactato, Alfa-Glucosidase, Alcalinização Succinato, Beta-N-Acetil-Galactosaminidase, Alfa-Galactosidase, Fosfatase, Assimilação Glicina Arilamidase, Ornitina Descarboxilase, Lisina Descarboxilase, Assimilação L-Histidina, Cumarato, Beta-Glucoronidase, Resistência O/129, Glu-Gli-Arg-Arilamidase, Assimilação L-Malato, ELLMAN e Assimilação L-Lactato.

Para a inoculação desse cartão, colônias de culturas com 18-24 horas foram suspensas em solução de NaCl 0,45% (segundo as instruções do fabricante) e/ou 0,85% (modificação introduzida) e então foi seguido o procedimento recomendado, como mostrado no Apêndice 2.

Para a realização do teste de suscetibilidade a antimicrobianos automatizado foi empregado o Cartão AST-GN de acordo com as instruções do fabricante. Os antibióticos presentes no cartão AST-GN são os seguintes: ampicilina, ampicilina/sulbactam, amicacina, aztreonam, ceftazidima, cefazolina, cefepime, cefotetan, ceftriaxona, cefuroxima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem, nitrofurantoína, piperacilina, piperacilina/tazobactam, sulfametoxazol/trimetoprim e tobramicina.

### 4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A identificação molecular das estirpes de *Aeromonas* foi realizada empregando a metodologia de PCR-RFLP do gene 16S rDNA, de acordo com BORREL *et al*, 1997 e FIGUERAS *et al.*, 2000.

#### 4.3.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído pelo método da fervura (OLSVIK e STROCKBINE, 1993). Cerca de 3 a 5 colônias de *Aeromonas* spp. foram suspensas em 500 µl de água destilada estéril e as suspensões foram fervidas por 10 minutos para liberação do DNA e então centrifugadas a ~13000 x g (aprox. 14.000 rpm, microcentrífuga Eppendorf modelo 5410) por 1 minuto. Os sobrenadantes (aproximadamente 150 µl) foram transferidos para novos tubos e mantidos a -20°C até o momento da análise.

#### 4.3.2 Estimativa da concentração de DNA

A estimativa da quantidade de DNA foi feita em gel de agarose por comparação entre a intensidade de fluorescência emitida sob luz ultra-violeta pelo DNA da amostra com a emitida pelo Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™) (SAMBROOK e RUSSELL, 2001).

#### 4.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O gene 16S rDNA completo foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores descritos por BORRELL *et al.*, 1997:

forward 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' e

reverse 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', gerando um fragmento de 1502 pares de base (PB).

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µl, contendo 2,5 µl de tampão da Taq polimerase 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.8, 500mM KCl, 0,8% Nonidet P40, Fermentas), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas), 1 µl de cada iniciador (10 pmol/l), 13,8 µl de água ultra pura estéril e 4,0 µl de DNA (aproximadamente 5-10 ng).

Para a reação utilizou-se o termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems). O seguinte programa foi empregado: 1 ciclo de 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 20 segundos e 72°C por 2 minutos; seguidos de 1 ciclo a 72°C por 7 minutos.

A detecção do produto de PCR foi realizada através de eletroforese em agarose a 0,8% em tampão TBE 1X (Tris-hidroximetilaminometano 89 mmol/L, Ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,3) (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem de 60V (~45mA) por aproximadamente 1 hora. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) durante 15 minutos, observado e fotodocumentado sob luz UV (302nm) utilizando o sistema UVP Imaging System.

#### 4.3.4 Digestão do produto de PCR com endonucleases (PCR-RFLP)

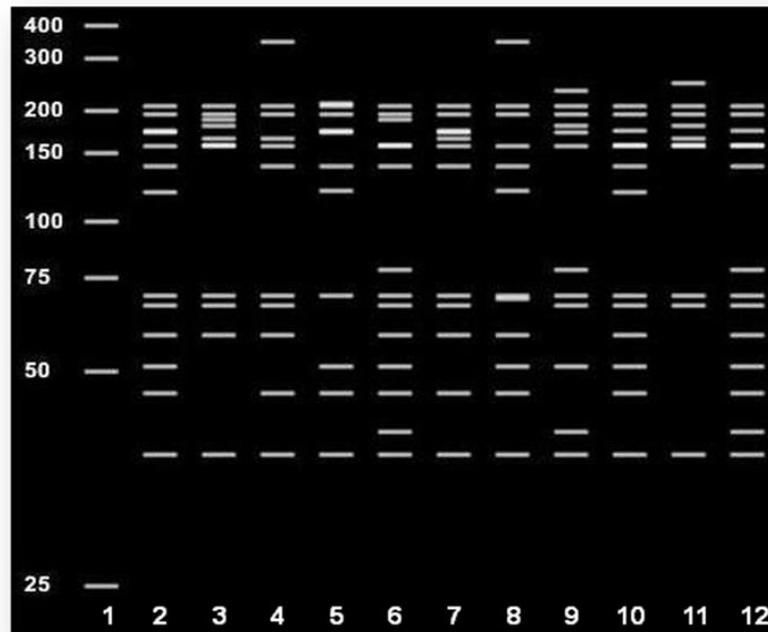
O ensaio de PCR-RFLP foi realizado de acordo com BORRELL *et al.*, 1997 e FIGUERAS *et al.*, 2000.

A digestão enzimática do DNA foi realizada com as endonucleases de restrição *AluI* e *MboI* (10U/µl, Fermentas). A reação foi realizada em volume final de 10 µl contendo 3µl de DNA (aproximadamente 100 ng), tampão Tango 1x (Fermentas, Tango 10x: Tris-acetato 33mM pH 7,5, acetato de magnésio 10mM, acetato de potássio 66 mM e BSA 0,1mg/ml) e 3U de cada enzima.

A mistura de reação foi incubada por cerca de 4 horas a 37°C. Alíquotas de 5µl de cada reação foram misturados com 2µl de solução de aplicação de amostra FSUDS (azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol 0,25% (p/v), Ficoll 25% (p/v), SDS 0,5% (p/v), Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 e EDTA 1 mmol/L pH 8,0) e aplicadas em gel de poliacrilamida 10% (1,25ml de solução de acrilamida/bisacrilamida 29:1 a 40%, 1 ml do tampão TBE 5x (tris 445 mmol/L, borato 445 mmol/L, EDTA 5 mmol/L), 5 ul de Temed (N,N,N',N'-Tetrametilenodiamina), 40ul de Persulfato de Amônio (APS) e 2,705ml de Água ultra-pura) em tampão TBE 1x. A corrida eletroforética foi realizada em 130V em tampão TBE 1x por aproximadamente 50 minutos. Os géis foram corados utilizando uma solução de brometo de etídeo (0.5 µg/ml) durante 15 minutos, observados e fotodocumentado sob luz UV (302nm).

A identificação das estirpes foi realizada de acordo com os padrões estabelecidos por BORRELL *et al.*, 1997 (FIGURA 2), FIGUERAS *et al.*, 2000 e ALPERI *et al.* 2008.

**FIGURA 2** – PADRÕES DE PCR-RFLP DO GENE 16S rDNA PARA ESPÉCIES DE *Aeromonas*, SEGUNDO BORRELL *et al.*, 1997.



NOTA: Gel virtual gerado com auxílio do programa CLC *Main Workbench* versão 5.6 (KNUDSEN, B. *et al* 2009), utilizando sequências do gene 16S rDNA depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). **1.** Marcador de massa molecular 25 pb. **2.** *A. allosaccharophila* CECT 4199. **3.** *A. caviae* ATCC 15467 **4.** *A. hydrophila* ATCC 7966 **5.** *A. eucrenophila* ATCC 23309T. **6.** *A. jandaei* ATCC 49568 **7.** *A. media* ATCC 33907 **8.** *A. salmonicida* cepa CIP 57.50 **9.** *A. schubertii* ATCC 43700 **10.** *A. sobria* cepa NCIMB 12065 **11.** *A. trota* ATCC 48657 **12.** *A. veronii* biovar *veronii* ATCC 35624.

#### 4.3.5 Sequenciamento de DNA

Os produtos de PCR (6 µl) foram tratados com as enzimas Exonuclease I (USB, 3,3 U) e SAP (Fosfatase alcalina de camarão - USB, 0,66 U) com o objetivo de eliminar os resíduos de iniciadores e de dNTP. Os tubos contendo a mistura foram incubados a 37°C durante 45 minutos, e então a 80°C por 15 minutos. O produto foi utilizado na reação de seqüenciamento, baseada no método de SANGER (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977) modificado utilizando dideoxinucleotídeos

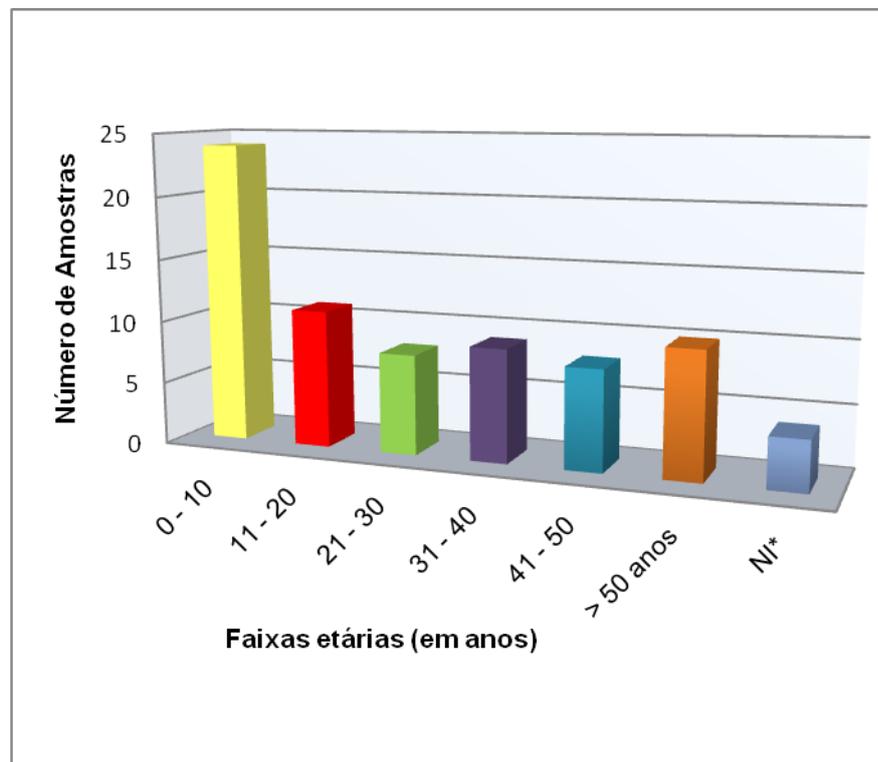
fluorescentes. As reações foram realizadas em volume final de 10µL contendo 10pmol de oligonucleotídeo iniciador, aproximadamente 200 ng do produto de PCR purificado e 4µL do reagente *DYEnamic ET Sequence Premix Terminator* (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*, Amersham Biosciences). Foi utilizado o seguinte programa para os iniciadores do sistema 1 e 2: 30 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 30s, 60°C por 30s. O produto da reação de seqüenciamento foi transferido para tubo plástico de 500 µL ao qual foram adicionados 2µL de acetato de amônio 7,5M e 60 µL de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada em agitador tipo vórtex, mantida a temperatura ambiente por 20 minutos e então centrifugada por 25min a 14000 rpm em microcentrífuga Eppendorf modelo 5410. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com 250 µL de etanol 70% e seco em estufa a 37°C. O DNA foi dissolvido em 4 µL de Formamide Loading Dye (Applied Biosystems) e submetido à eletroforese no Seqüenciador automático de DNA modelo ABI Prism 377 do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. As seqüências obtidas foram analisadas com os programas BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), BLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e CLUSTAL W (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994) (<http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw/>).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

A Figura 3 mostra a distribuição por idade, em intervalos de 10 anos, dos pacientes dos quais as estirpes de *Aeromonas* analisadas neste trabalho foram isoladas.

**FIGURA 3** – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS REFERENTES À FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES.

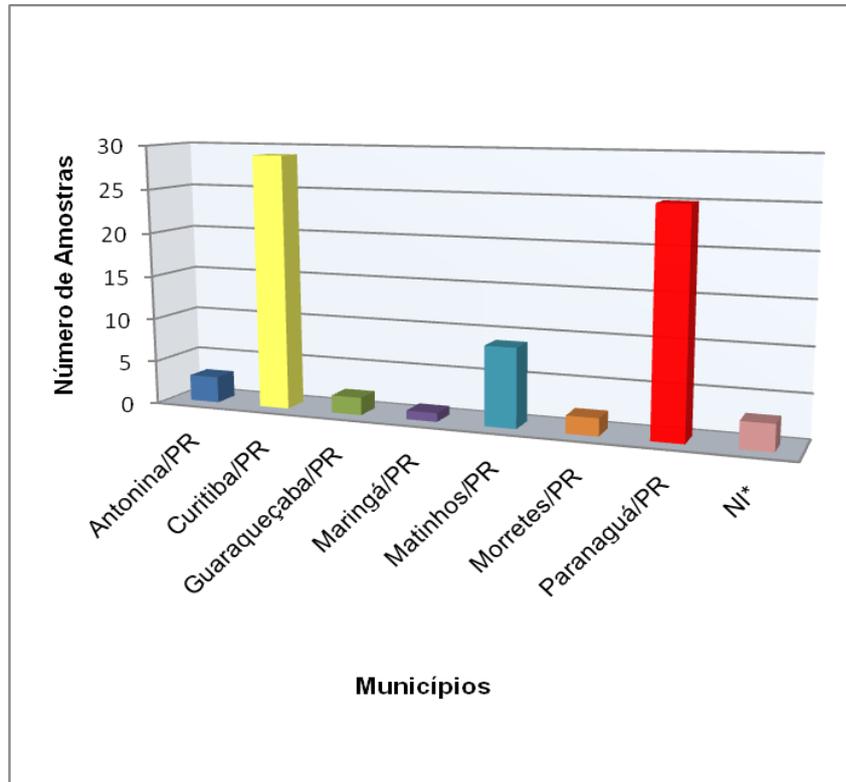


NOTA: \* NI: Dados não informados.

Nesta figura pode-se observar que embora *Aeromonas* tenha sido isolada de indivíduos de todas as faixas etárias, a prevalência é maior na faixa de 0 a 10 anos de idade.

A Figura 4 mostra a distribuição, por região geográfica, dos isolados.

**FIGURA 4 – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS REFERENTES À LOCALIDADE DOS PACIENTES.**



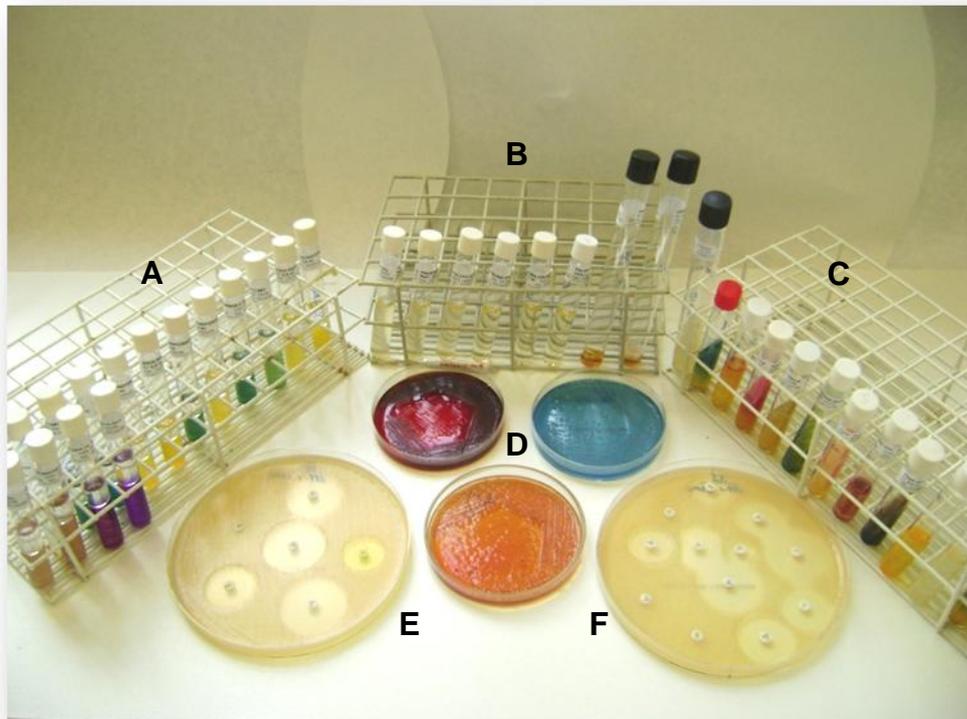
NOTA: \* NI: Município não informado.

A Figura 4 mostra que as pessoas com infecção causada por *Aeromonas* são provenientes de várias localidades do Paraná, em especial da região litorânea. Essa distribuição decorre da área de atuação do LACEN sede Curitiba/PR. Apenas um isolado é proveniente de outra região do Estado, e foi recuperado de um caso de bacteremia e encaminhado ao LACEN-Curitiba para identificação. Isto sugere a distribuição de *Aeromonas* em todo o Estado, e que possivelmente essas bactérias não estejam sendo diagnosticadas. A maior frequência de *Aeromonas* ocorreu em Curitiba/PR (39%) e Paranaguá/PR (34%).

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA – MÉTODO CONVENCIONAL

A identificação das 74 estirpes de *Aeromonas* utilizando testes bioquímicos convencionais foi realizada com um conjunto de 28 ensaios ilustrados na Figura 5.

**FIGURA 5** – CONJUNTO DE PROVAS BIOQUÍMICAS EMPREGADO NA IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES DE *Aeromonas*



FONTE: O autor (2009).

NOTA: **A.** Testes para detectar a utilização de aminoácidos e carboidratos. **B.** Testes de halofilia e VP. **C.** Provas de identificação convencionais (motilidade, esculina, citrato de Simmons, gás, entre outros). **D.** Meios de cultura para detectar a produção de  $\beta$ -hemólise (Ágar sangue) e utilização da lactose (Ágar MacConkey e CLED). **E e F.** Antibiograma (Ágar Mueller-Hinton).

Os testes estão descritos no item 4.2.1 e foram realizados e interpretados de acordo com ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003. Nas situações onde os resultados mostraram-se duvidosos, as análises foram repetidas no mínimo 2 vezes para confirmação do fenótipo.

Os resultados dos ensaios bioquímicos estão descritos no Apêndice 3 para cada estirpe, e mostrados de forma resumida na Tabela 1, de acordo com a espécie. Os resultados obtidos confirmaram que as estirpes analisadas pertencem ao gênero

*Aeromonas*, e permitiram a identificação de 4 espécies: *A. caviae* (69%), *A. veronii* biovar sobria (17,5%), *A. hydrophila* (9,5%) e *A. trota* (4%).

**TABELA 1** – FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE DAS ESTIRPES DE *Aeromonas* EM ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA CONVENCIONAL E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DE ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003.

Provas bioquímicas <sup>1</sup>	Espécies de <i>Aeromonas</i>							
	<i>A. trota</i> (n=3) <sup>2</sup>	<i>A. trota</i> (n=16) <sup>3</sup>	<i>A. hydrophila</i> (n=7) <sup>2</sup>	<i>A. hydrophila</i> (n=25) <sup>3</sup>	<i>A. veronii</i> biovar sobria (n=13) <sup>2</sup>	<i>A. veronii</i> biovar sobria (n=25) <sup>3</sup>	<i>A. caviae</i> (n=51) <sup>2</sup>	<i>A. caviae</i> (n=25) <sup>3</sup>
Glucose	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Gás (glucose)	100%	69%	86%	92%	100%	92%	0%	0%
H <sub>2</sub> S	0%	6%	0%	92%	0%	68%	0%	0%
Indol	67%	100%	71%	96%	92%	100%	63%	84%
Motilidade	100%	100%	100%	100%	85%	96%	69%	88%
ADH	100%	94%	100%	100%	100%	100%	90%	92%
LDC	100%	100%	100%	100%	92%	96%	0%	0%
ODC	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Halofilia 0% NaCl	100%	100%	100%	100%	100%	100%	90%	100%
1% NaCl	100%	NR	100%	NR	100%	NR	100%	NR
3% NaCl	100%	100%	100%	100%	92%	100%	96%	100%
6% NaCl	0%	NR	0%	NR	0%	NR	0%	NR
8% NaCl	0%	NR	0%	NR	0%	NR	0%	NR
10% NaCl	0%	NR	0%	NR	0%	NR	0%	NR
VP	0%	0%	100%	92%	100%	88%	0%	0%
Citrato de Simmons	67%	94%	43%	88%	77%	52%	67%	88%
Uréia Christensen	0%	0%	0%	0%	0%	0%	2%	8%
Esculina	0%	0%	100%	92%	0%	0%	98%	76%
L-arabinose	0%	0%	86%	84%	31%	12%	100%	100%
m-inositol	0%	0%	0%	0%	8%	0%	2%	0%
Lactose	33%	0%	0%	16%	23%	12%	53%	60%
D-manitol	100%	69%	100%	96%	92%	100%	94%	100%
Manose	100%	100%	100%	100%	92%	100%	27%	32%
L-rhamnose	0%	0%	14%	24%	0%	0%	0%	0%
Sacarose	67%	19%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Salicina	0%	0%	86%	76%	0%	0%	82%	76%
D-sorbitol	0%	0%	0%	0%	0%	0%	6%	4%
Celobiose	100%	100%	0%	0%	54%	20%	76%	100%
Maltose	100%	100%	100%	100%	100%	92%	100%	100%
β-hemólise	100%	50%	100%	100%	100%	100%	47%	52%
O/129 150 µg	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

NOTA: 1. Resultados indicam porcentagem de reações positivas 2. Resultados do presente trabalho. 3. Resultados descritos por ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003. ADH – arginina dihidrolase; LDC – lisina descarboxilase; ODC – ornitina descarboxilase; Gás – produção de gás à partir da fermentação da glucose; H<sub>2</sub>S – produção de sulfeto de hidrogênio; VP – Voges Proskauer; O/129 150 µg – resistência ao composto 2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina, 150 µg; NR – Não realizado.

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA

O Sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact identificou inicialmente algumas das estirpes estudadas como *Vibrio vulnificus* e *Vibrio cholerae*. A identificação errônea de *Aeromonas* como pertencendo ao gênero *Vibrio* tem sido descrita na literatura (ABBOTT *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 2003; SOLER *et al.*, 2003, SUREK *et al.*, 2008). Com base no trabalho de PARK *et al.*, 2003, 33 estirpes foram analisadas com o cartão GN utilizando NaCl 0,85% para preparar a suspensão bacteriana e NaCl 0,45% como recomendado pelo fabricante.

Os resultados obtidos estão indicados no Quadro 3.

**QUADRO 3** – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA UTILIZANDO NaCl 0,45% E 0,85% PARA O PREPARO DO INÓCULO

Estirpes	VITEK <sup>®</sup> 2 Compact		Identificação Convencional
	Salina 0,45%	Salina 0,85%	
LACEN-67 MS-81 LACEN-68 MS-82 LACEN-69 MS-83 LACEN-71 MS-84 LACEN-72 MS-86 LACEN-73 MS-88 LACEN-74 MS-89 MS-76 MS-90 MS-77 MS-91 MS-78 MS-92 MS-80	<i>A. hydrophila/caviae</i>	<i>A. hydrophila/caviae</i>	<i>A. caviae</i>
MS-85	<i>A. hydrophila/caviae</i>	Padrão não reativo	<i>A. caviae</i>
LACEN-19 MS-79 MS-87	<i>A. hydrophila/caviae</i>	<i>A. hydrophila/caviae</i>	<i>A. hydrophila</i>
LACEN-2	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. trota</i>
LACEN-7	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. trota</i>
LACEN-94	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. trota</i>
LACEN-20 MS-75	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i>
LACEN-70	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i>
MS-93	<i>A. hydrophila/caviae</i> <i>A. sobria</i> <i>A. veronii</i>	<i>A. sobria</i> <i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i>
LACEN-95	<i>A. hydrophila/caviae</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i>

Estes resultados indicam que a utilização do NaCl 0,85% no preparo do inóculo evita a identificação de *Aeromonas* erroneamente como *Vibrio*.

Por essa razão foi adotado esse procedimento para a análise das demais estirpes. Os resultados da identificação bioquímica automatizada para as 74 estirpes estão indicados no Apêndice 4, por estirpe, e de forma resumida (por espécie) na Tabela 2.

**TABELA 2** - FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE PARA OS ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA REALIZADA PELO SISTEMA VITEK® 2 Compact

Provas Bioquímicas <sup>1</sup>	Espécies identificadas (n=74)			
	<i>A. veronii</i> (n=1)	<i>A. hydrophila</i> (n=9)	<i>A. sobria</i> (n=13)	<i>A. caviae</i> (n=51)
Ala-Fe-Pro Arilamidase	0%	44%	77%	78%
Adonitol	0%	0%	0%	0%
L-Pirrolidonil-Arilamidase	0%	0%	0%	6%
L-Arabitól	0%	0%	0%	0%
D-Celobiose	100%	11%	23%	76%
Beta-galactosidase	100%	100%	100%	100%
Produção de H <sub>2</sub> S	0%	78%	0%	0%
Beta-N-acetil-glucosaminidase	100%	100%	100%	98%
Glutamil Arilamidase pNA	0%	0%	75%	0%
D-Glucose	100%	100%	100%	100%
Gama-glutamil-transferase	0%	22%	33%	39%
Fermentação/glucose	100%	89%	92%	100%
Beta-Glucosidase	0%	22%	0%	82%
D-Maltose	100%	100%	100%	100%
D-Manitol	100%	100%	100%	100%
D-Manose	100%	100%	100%	14%
Beta-Xilosidase	0%	0%	0%	2%
Beta-Alanina arilamidase pNA	0%	0%	0%	0%
L-Prolina Arilamidase	100%	56%	100%	96%
Lipase	100%	100%	58%	92%
Palatinose	100%	67%	25%	2%
Tirosina Arilamidase	100%	67%	100%	90%
Urease	0%	0%	0%	4%
D-Sorbitol	0%	0%	0%	8%
Sacarose	100%	100%	92%	98%
D-Tagatose	0%	0%	0%	0%
D-Trealose	100%	100%	100%	100%
Citrato (Sódio)	100%	0%	75%	0%
Malonato	0%	0%	0%	0%

CONTINUA

				CONCLUSÃO
5-Queto-D-Gluconato	0%	0%	0%	0%
Alcalinização L-Lactato	0%	78%	25%	90%
Alfa-Glucosidase	0%	0%	8%	8%
Alcalinização Succinato	100%	89%	100%	96%
Beta-N-Acetil-Galactosaminidase	0%	0%	25%	0%
Alfa-Galactosidase	100%	0%	0%	0%
Fosfatase	0%	0%	0%	2%
Assimilação Glicina Arilamidase	0%	11%	25%	2%
Ornitina Descarboxilase	0%	0%	0%	0%
Lisina Descarboxilase	0%	0%	17%	0%
Assimilação L-Histidina	0%	0%	0%	0%
Cumarato	100%	100%	100%	98%
IBeta-Glucoronidase	0%	0%	0%	0%
Resistência O/129 (comp.vibro.)	0%	67%	67%	100%
Glu-Gli-Arg-Arilamidase	100%	78%	100%	69%
Assimilação L-Malato	0%	0%	33%	10%
ELLMAN	100%	78%	100%	98%
Assimilação L-Lactato	0%	0%	8%	0%

NOTA: 1. Resultados indicam porcentagem de reações positivas;

Com a modificação na concentração do líquido de preparo do inóculo, o sistema de identificação bacteriana automatizada VITEK<sup>®</sup> 2 Compact também identificou as 74 estirpes como membros do gênero *Aeromonas*.

As seguintes espécies de *Aeromonas* constam no banco de dados do VITEK<sup>®</sup> 2 Compact: *A. hydrophila* / *A. caviae*, *A. salmonicida*, *A. sobria* e *A. veronii*.

Esse sistema não diferencia *A. hydrophila* de *A. caviae*, apenas informa a probabilidade de ser uma das espécies *A. hydrophila* / *A. caviae*. Para fazer a distinção entre as duas espécies é necessário realizar um teste adicional, Voges-Proskauer (VP), de forma manual.

O sistema Vitek qualifica os resultados utilizando categorias para a identificação das estirpes dependendo do grau de discriminação. Este depende da probabilidade fornecida pelo software, calculada com base nos resultados dos testes. As categorias são excelente (96-99% de probabilidade), muito bom (93-95% de probabilidade), bom (89-92% de probabilidade), aceitável (85-88% de probabilidade), fraca discriminação e não identificado (Apêndice 2).

Entre as 74 estirpes analisadas, quatro espécies de *Aeromonas* foram identificadas: *A. caviae* (69%), *A. sobria* (17,6%), *A. hydrophila* (12,1%) e *A. veronii* (1,3%).

Para *A. hydrophila/A. caviae* (que foram diferenciadas pelo teste de VP), 90% das estirpes foram identificadas com grau de discriminação excelente, 8,3% com muito bom e 1,7% com boa probabilidade. Para *A. sobria* 53,8% das estirpes foram identificadas com grau de discriminação excelente, 15,4% com muito bom, 15,4% com boa probabilidade e 15,4% com fraca discriminação. Apenas uma *A. veronii* foi encontrada na amostra, com probabilidade excelente.

#### 5.4 COMPARAÇÃO ENTRE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA CONVENCIONAL E AUTOMATIZADA

A Tabela 3 compara os resultados da identificação bioquímica das estirpes através dos sistemas convencional e automatizado.

**TABELA 3** – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES DE *Aeromonas* ENTRE OS MÉTODOS BIOQUÍMICOS CONVENCIONAL E AUTOMATIZADO

ID BIOQ. CONVENCIONAL	ID BIOQ. AUTOMATIZADA				TOTAL ID BIOQ. CONV. <sup>1</sup>
	<i>A. caviae</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>	
<i>A. caviae</i>	51				51
<i>A. hydrophila</i>		7			7
<i>A. trota</i>			3		3
<i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i>		2	10	1	13
TOTAL ID BIOQ. AUTO. <sup>2</sup>	51	9	13	1	74

NOTA: **1 e 2.** Número total de estirpes identificadas pelos Métodos Bioquímicos Convencional e Automatizado, respectivamente.

Como indicado nas Tabelas 1, 2, 3 e no Quadro 3, houveram discrepâncias entre os sistemas utilizados na identificação bioquímica das estirpes de *Aeromonas*. Esse resultado não é inesperado, uma vez que há relatos sobre as limitações que os sistemas automatizados apresentam na identificação de *Aeromonas* (ABBOTT *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 2003).

## 5.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS – MÉTODO CONVENCIONAL

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das estirpes de *Aeromonas* identificadas é mostrado na Tabela 4 e ilustrado na Figura 6.

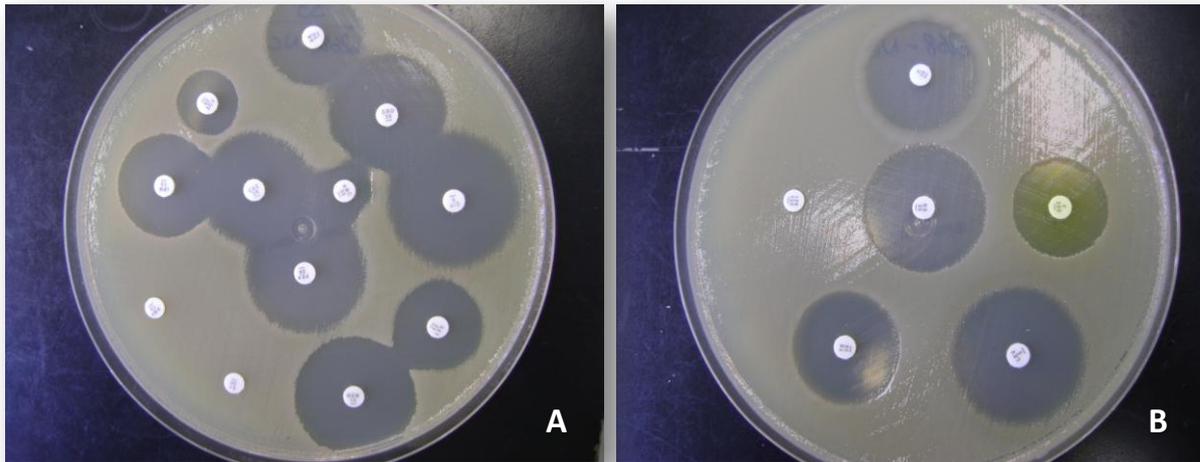
**TABELA 4** – PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS ESTIRPES DE *Aeromonas* AVALIADO PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO

Antimicrobianos <sup>1</sup>	Espécies (número de espécies)			
	<i>A. trota</i> (n=3)	<i>A. hydrophila</i> (n=7)	<i>A. veronii</i> biovar sobria (n=13)	<i>A. caviae</i> (n=51)
Ác. Nalidíxico	0%	14%	8%	2%
Amicacina	0%	0%	0%	0%
Amoxi/Ac. Clav.	0%	57%	13%	8%
Ampicilina	0%	100%	100%	100%
Aztreonam	0%	0%	0%	0%
Cefalotina	100%	86%	0%	88%
Cefazolina	100%	71%	20%	73%
Cefepima	0%	0%	0%	0%
Cefoxitina	0%	14%	0%	27%
Ceftazidima	0%	0%	0%	0%
Ceftriaxona	0%	0%	0%	0%
Ciprofloxacino	0%	0%	0%	0%
Cloranfenicol	0%	0%	0%	4%
Imipenem	0%	0%	0%	0%
Levofloxacino	0%	0%	0%	0%
Meropenem	0%	0%	0%	0%
Nitrofurantoína	0%	0%	0%	0%
Sulfa/Trimet	0%	0%	0%	29%
Tetraciclina	0%	0%	15%	14%

NOTA: 1. Resultados representam a porcentagem de estirpes resistentes.

Como esperado, *A. trota* foi suscetível à ampicilina, e *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar sobria e *A. caviae* resistentes a esse antibiótico. Esses resultados auxiliam na identificação dessas estirpes e estão de acordo com o descrito por ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003. As estirpes foram suscetíveis a maioria dos antimicrobianos testados.

**FIGURA 6** – TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS AVALIADO PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO



FONTE – O autor (2009)

NOTA – Em **A**, estirpe de *A. caviae* (LACEN-53) mostrando resistência à ampicilina e cefalotina, em **B** a resistência intrínseca ao agente vibriostático O/129 150 µg.

## 5.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS - MÉTODO AUTOMATIZADO

O resultado do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos realizado pelo aparelho VITEK® 2 Compact é mostrado na Tabela 5.

**TABELA 5** – PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS ESTIRPES DE *Aeromonas* AVALIADO PELO MÉTODO AUTOMATIZADO VITEK® 2 Compact.

Antimicrobianos <sup>1</sup>	Espécies (número de espécies)			
	<i>A. veronii</i> (n=1)	<i>A. hydrophila</i> (n=9)	<i>A. sobria</i> (n=13)	<i>A. caviae</i> (n=51)
Amicacina	NR	0%	0%	0%
Amp/Sulbactam	NR	80%	77%	80%
Ampicilina	NR	90%	77%	92%
Aztreonam	NR	0%	0%	2%
Cefazolina	NR	60%	15%	72%
Cefepima	NR	0%	0%	2%
Cefotetan	NR	0%	0%	0%
Ceftazidima	NR	0%	0%	2%
Ceftriaxona	NR	0%	0%	0%
Cefuroxima	NR	0%	0%	0%
Cefuroxima Ax	NR	0%	0%	0%
Ciprofloxacina	NR	0%	0%	0%
Gentamicina	NR	0%	0%	0%
Imipenem	NR	0%	0%	2%

CONTINUA

				CONCLUSÃO
Levofloxacina	NR	0%	0%	0%
Meropenem	NR	0%	0%	2%
Nitrofurantoína	NR	0%	0%	2%
Pip/Tazob	NR	0%	0%	2%
Piperacilina	NR	0%	0%	4%
Sulfa/Trimet	NR	10%	0%	26%
Tobramicina	NR	0%	0%	0%

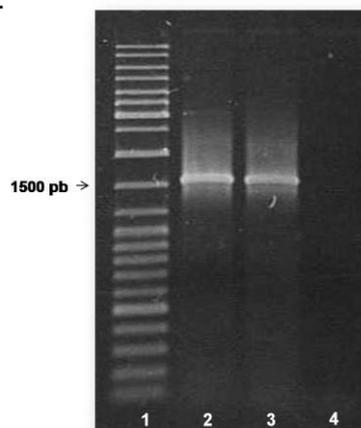
NOTA: 1. Resultados representam a porcentagem de estirpes resistentes. NR = Não realizado

Os resultados do teste de suscetibilidade para *A. veronii* não foram liberados pelo aparelho, a razão é desconhecida. A resposta à ampicilina para *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar sobria (*A. sobria*) e *A. caviae* não foi uniforme, como esperado, embora a maioria tenha se comportado como resistente. Como observado no teste de suscetibilidade realizado pelo método de disco difusão, as estirpes são suscetíveis a maioria dos antimicrobianos testados.

## 5.7 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A identificação das estirpes foi realizada por PCR-RFLP do gene 16S rDNA como descrito no item 4.3.3. A Figura 7 representa um gel de agarose indicando fragmentos de produtos de PCR com tamanho de aproximadamente 1500 pb, os quais foram subseqüentemente tratado com as enzimas *AluI* e *MboI*.

**FIGURA 7** – PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rDNA DE *Aeromonas* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR.

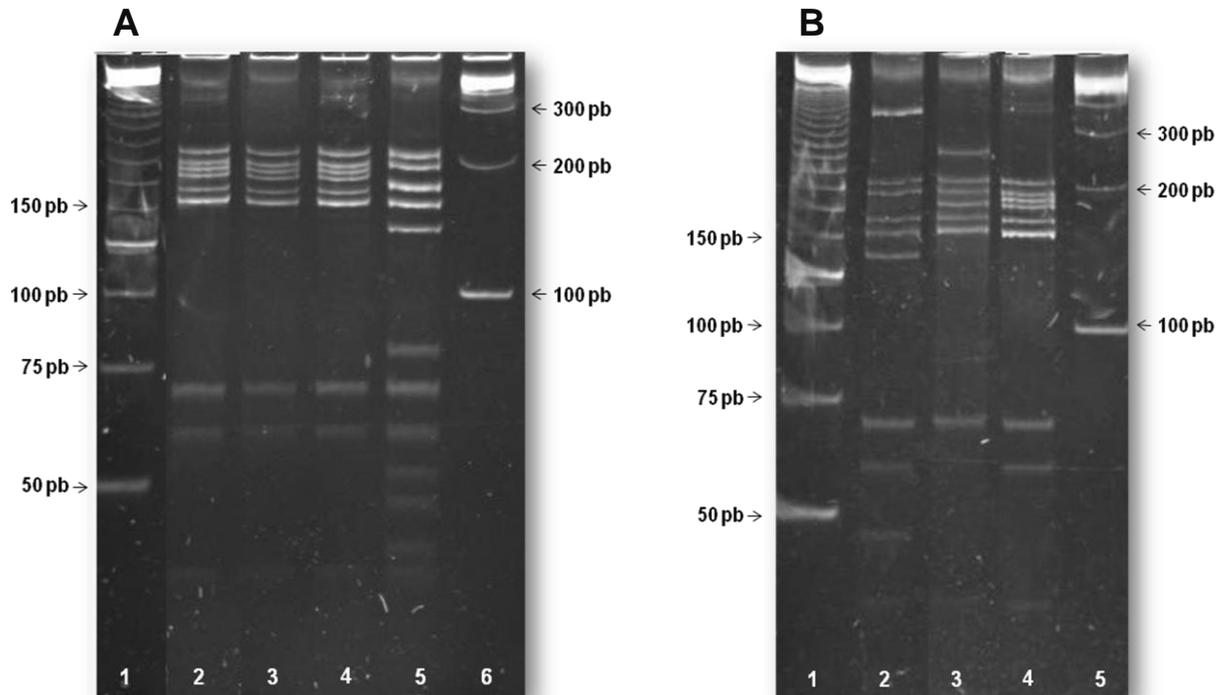


NOTA: Gel de agarose 0,8%, pb – pares de base 1. Marcador de massa molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) 2 e 3. Produto de amplificação do gene 16S rDNA de *Aeromonas* (LACEN-19 e LACEN-49, respectivamente) 4. Branco

Os resultados de PCR-RFLP foram interpretados de acordo com BORRELL *et al.*, 1997, FIGUERAS *et al.*, 2000 e ALPERI *et al.* 2008.

Os perfis de PCR-RFLP observados para 66 das 74 estirpes estão representados nas Figuras 8A e 8B.

**FIGURA 8** – PADRÕES DE PCR-RFLP DO GENE 16S rDNA REPRESENTATIVOS PARA AS ESTIRPES DE *Aeromonas* ANALISADAS.

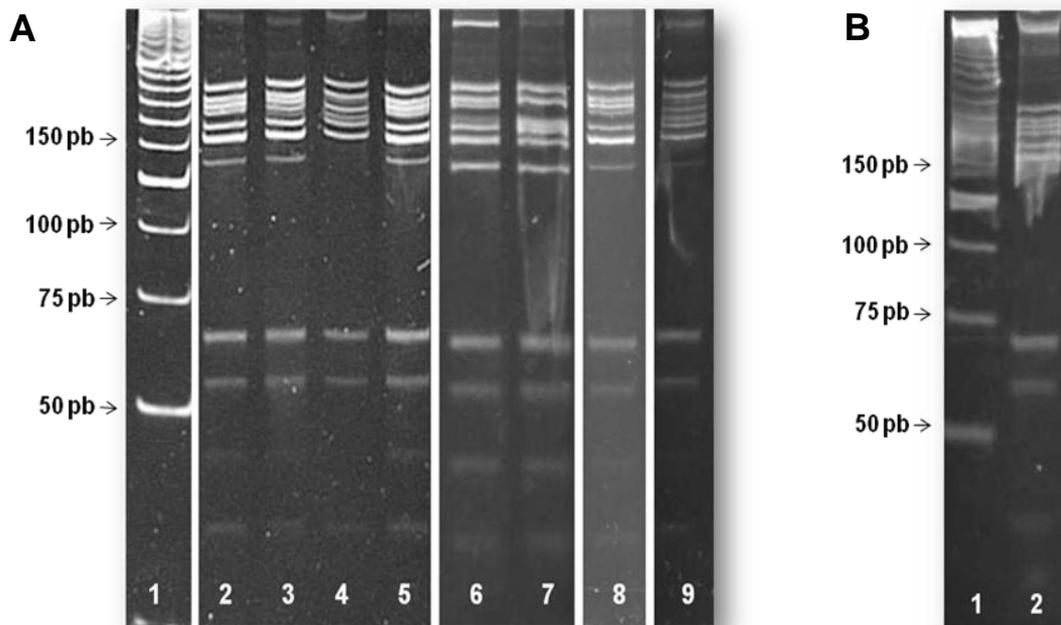


NOTA: Eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, pb= pares de base **A.** 1- Marcador de massa molecular 25 pb (Fermentas) **2 a 4-** *A. caviae* (MS-89, MS-91 e MS-92) **5-** *A. veronii* biovar sobria (MS-93) **6-** Marcador de massa molecular 100 pb (Fermentas). **B.** 1- Marcador de massa molecular 25 pb (Fermentas) **2-** *A. hydrophila* (LACEN-60) **3-** *A. trota* (LACEN-94) **4-** *A. caviae* (MS-90) **5-** Marcador de massa molecular 100 pb (Fermentas).

A Figura 8 mostra os padrões de PCR-RFLP característicos para *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. trota* e *A. veronii* biovar sobria, que foram as espécies identificadas no presente trabalho. Segundo a identificação molecular a espécie mais freqüente foi *A. caviae* (51 estirpes – 69%), seguida de *A. veronii* biovar sobria (13 estirpes – 17,5%), *A. hydrophila* (7 estirpes - 9,5%) e *A. trota* (3 estirpes – 4%).

Entretanto, 8 das estirpes identificadas, pelo perfil bioquímico, como *A. caviae* e uma *A. hydrophila* apresentaram padrões de PCR-RFLP que não eram compatíveis com os descritos por BORRELL *et al.*, 1997, e FIGUERAS *et al.*, 2000. Estes padrões estão indicados na Figura 9.

**FIGURA 9** – PADRÕES DE PCR-RFLP ATÍPICOS OBSERVADOS PARA ESTIRPES COM PERFIL BIOQUÍMICO DE *A. caviae* e *A. hydrophila*.



NOTA: Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% **A.** 1- Marcador de massa molecular 25 pb (Fermentas) **2, 3, 5 e 8** – padrão compartilhado pelas estirpes LACEN-10, LACEN-11, LACEN-18 e MS-85 de *A. caviae*. **4 e 9** - padrão apresentado pelas estirpes LACEN-14 e MS-88 de *A. caviae*. **6** - padrão atípico apresentado pela estirpe LACEN-49 de *A. caviae*. **7** - padrão apresentado pela estirpe MS-82 de . **B.** 1 - Marcador de massa molecular 25 pb (Fermentas) **2** - *A. hydrophila* padrão atípico (LACEN-19).

O padrão atípico mais comum, apresentado por 4 estirpes, e indicado na Figura 9A e linhas 2, 3, 5 e 8, é compatível com o perfil atípico 1 descrito por ALPERI *et al.* 2008. Difere do padrão típico pela presença de uma banda extra de aproximadamente 130 pb.

Os outros padrões apresentam maior diferença em relação ao padrão típico de *A. caviae*, tanto pelo número quanto pelo tamanho das bandas. Os padrões mostrados na Figura 9A e linhas 4 e 9 são similares ao perfil atípico 6 de ALPERI *et al.* 2008; e os observados nas linhas 6 e 7 correspondem, respectivamente, aos perfis atípicos 12 e 2 de ALPERI *et al.*, 2008. Isto confirma que essas estirpes pertencem à espécie *A. caviae*.

A estirpe LACEN-19, identificada através de testes bioquímicos convencionais e automatizados como *A. hydrophila*, apresentou perfil de PCR-RFLP característico de *A. caviae* (Figura 9B, linha 2). O gene 16S rDNA desta estirpe foi parcialmente seqüenciado e comparado com as seqüências correspondentes de *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. caviae* ATCC 15467 disponíveis no GenBank sob número de acesso X60404 e X60409, respectivamente.

A Figura 10 mostra a região 5' do gene 16S rDNA. Esta região é conservada em *A. hydrophila* e *A. caviae*, com exceção de uma das regiões variáveis do 16S rDNA, destacada em vermelho, conforme descrito por MARTINEZ-MURCIA, BENLLOCH, COLLINS, 1992. Pode ser observado que a seqüência da estirpe LACEN-19 apresenta maior similaridade com a de *A. caviae* ATCC 15467. Esse resultado sugere que a estirpe LACEN-19 é uma *A. caviae* com comportamento bioquímico distinto das demais dessa espécie.

**FIGURA 10** - ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO 5' DOS GENES 16S rDNA DAS ESTIRPES DE *Aeromonas* LACEN-19, *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. caviae* ATCC 15467.

LACEN-19	CATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACG	60
Acaviae	CATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACG	60
Ahydrophila	CATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACG	60
	*****	
LACEN-19	GGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTA	120
Acaviae	GGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTA	120
Ahydrophila	GGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTA	120
	*****	
LACEN-19	ATACCGCATAACGCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGC CGGATTGGATATG	180
Acaviae	ATACCGCATAACGCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGC CGGATTGGATATG	180
Ahydrophila	ATACCGCATAACGCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGC CGGATTGGATATG	180
	*****	
LACEN-19	CCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAGGATCCCTAGCTG	240
Acaviae	CCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAGGATCCCTAGCTG	240
Ahydrophila	CCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAGGATCCCTAGCTG	240
	*****	
LACEN-19	GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC	300
Acaviae	GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC	300
Ahydrophila	GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC	300
	*****	
LACEN-19	AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA	360
Acaviae	AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA	360
Ahydrophila	AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA	360
	*****	
LACEN-19	GAANGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTGAGTAAATATCTG	420
Acaviae	GAANGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTGAGTAAATATCTG	420
Ahydrophila	GAANGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTGAGTAAATATCTG	420
	*** ***** * ***** *	
LACEN-19	CTGACTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTTACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA	480
Acaviae	CTGGCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTTACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA	480
Ahydrophila	TCAACTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTTACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA	480
	*****	
LACEN-19	ATACGGAGGGTGCAAG	496
Acaviae	ATACGGAGGGTGCAAG	496
Ahydrophila	ATACGGAGGGTGCAAG	496
	*****	

NOTA : Os nucleotídeos idênticos são indicados por asteriscos. Estão destacados em vermelho os nucleotídeos que diferenciam *A. hydrophila* e *A. caviae*. As áreas em azul e vermelho enfatizam os locais de corte das enzimas de restrição *AluI* e *MboI*.

As Tabelas 6 e 7 comparam os resultados da identificação molecular por PCR-RFLP com os da identificação bioquímica convencional e automatizada.

**TABELA 6** – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES DE *Aeromonas* ENTRE OS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA CONVENCIONAL E MOLECULAR.

<b>ID BIOQ. CONVENCIONAL</b>	<i>A. caviae</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. trota</i>	<i>A. veronii</i> biovar sobria	TOTAL ID MOLEC. <sup>1</sup>
<b>ID MOLECULAR</b>					
<i>A. caviae</i>	51	1			52
<i>A. hydrophila</i>		6			6
<i>A. trota</i>			3		3
<i>A. veronii</i> biovar sobria				13	13
TOTAL ID BIOQ. CONV. <sup>2</sup>	51	7	3	13	74

NOTA: 1 e 2. Número total de estirpes identificadas pelos Métodos Molecular e Bioquímico Convencional, respectivamente.

**TABELA 7** – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES DE *Aeromonas* ENTRE OS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA E MOLECULAR.

<b>ID BIOQ. AUTOMATIZADA</b>	<i>A. caviae</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>	TOTAL ID MOLEC. <sup>1</sup>
<b>ID MOLECULAR</b>					
<i>A. caviae</i>	51	1			52
<i>A. hydrophila</i>		6			6
<i>A. trota</i>			3		3
<i>A. veronii</i> biovar sobria		2	10	1	13
TOTAL ID. BIOQ. AUTO. <sup>2</sup>	51	9	13	1	74

NOTA: 1 e 2. Número total de estirpes identificadas pelos Métodos Molecular e Bioquímico Automatizado, respectivamente.

Estes resultados mostram que os ensaios moleculares apresentam melhor correlação com a identificação bioquímica convencional.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 EPIDEMIOLOGIA

O gênero *Aeromonas* geralmente é dividido em 2 grupos principais, as espécies mesofílicas móveis e as psicrófilicas imóveis. O maior deles inclui as espécies mesofílicas e contém 14 fenoespécies que correspondem a pelo menos 17 genomoespécies (grupos de hibridização de DNA). A maioria dos isolados clínicos humanos pertence a seis genomoespécies: 1 (*A. hydrophila*), 4 (*A. caviae*), 8/10 (*A. veronii*), 9 (*A. jandaei*) e 14 (*A. trota*) (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

No Brasil ainda são poucos os relatos sobre isolados humanos de *Aeromonas*. A prevalência em crianças com diarreia foi estimada em cerca de 20%, e em adultos em 8,7%. A espécie mais frequentemente isolada é *A. caviae* (NOGIMOTO *et al.*, 1997; HOFER *et al.*, 2006; GHENGESH *et al.*, 2008).

Um estudo realizado no Rio Grande do Sul, em pacientes internados em decorrência de gastroenterite aguda, demonstrou a presença de *Aeromonas* em 27 (6,6%) dos doentes. O predomínio dessas bactérias ocorreu em crianças (0-10 anos de idade), mas *Aeromonas* foi isolada de pessoas em todas as faixas etárias. As seguintes espécies foram identificadas: *A. hydrophila* (51,8%), *A. caviae* (40,8%) e *A. veronii* biovar sobria (7,4%) (GUERRA *et al.*, 2007).

No presente trabalho quatro espécies de *Aeromonas* foram encontradas, sendo a que apresentou maior prevalência *A. caviae* (52 estirpes, 70,3%). As outras espécies identificadas foram *A. hydrophila* (6 estirpes, 8,1%), *A. veronii* biovar sobria (13 estirpes, 17,6%) e *A. trota* (3 estirpes, 4%) (Tabelas 6 e 7). Estes resultados também são similares aos descritos em estudos realizados em outros países (SINHA *et al.*, 2004).

Em relação aos dados do Brasil, o predomínio de *A. caviae* é compatível com os dados de NOGIMOTO *et al.*, 1997 e HOFER *et al.*, 2006. Entretanto esse resultado difere daquele encontrado por Guerra e colaboradores, que mostraram o predomínio de *A. hydrophila* em casos de gastroenterite no Rio Grande do Sul. Isto pode indicar o predomínio de espécies diferentes nas distintas regiões geográficas, mas também pode ser consequência da amostra analisada. No caso de Guerra e

colaboradores a amostra foi constituída apenas por pessoas internadas, o que pode indicar que eram casos mais graves de gastroenterite.

Os dados epidemiológicos fornecidos pelo LACEN-PR e por SUREK *et al.*, 2008, indicam que a maior frequência de isolamento de *Aeromonas* foi observada em crianças entre 0-10 anos (Quadro 2 e Figura 3), o que também foi mostrado nos demais trabalhos realizados no país (NOGIMOTO *et al.*, 1997; HOFER *et al.*, 2006).

Em relação à distribuição geográfica das *Aeromonas* no Paraná, deve-se ressaltar que 55 (74%) das estirpes analisadas são provenientes do LACEN para onde são encaminhadas as amostras fecais de surtos de diarreia ocorridos no Estado, predominantemente da 2ª Regional de Saúde que compreende o município de Curitiba e região metropolitana, assim como da 1ª Regional de Saúde que abrange os municípios localizados no litoral do Paraná.

As outras 19 estirpes foram isoladas de pessoas residentes em Curitiba/PR durante a realização de um estudo que visava determinar a importância desta bactéria como agente de gastroenterite na população desta cidade (SUREK *et al.* 2008). Desta forma, a amostra analisada é representativa apenas dessa localidade. Entretanto provavelmente *Aeromonas* esteja distribuída por todo o Estado, como sugere o isolado LACEN-95, recuperado de hemocultura em Maringá/PR e encaminhado para identificação no LACEN-Curitiba. GIBOTTI *et al.* 2000, analisando amostras de água coletadas em um rio na região de Cambé/PR encontraram em 45% das amostras a presença de espécies de *Aeromonas*, e que possuíam propriedades hemolíticas e hemaglutinantes.

Os resultados deste estudo sugerem também a ocorrência de um provável surto de gastroenterite causado por *A. veronii* biovar sobria em 2002. A bactéria foi isolada de 6 pessoas com gastroenterite, todas residentes em Matinhos/PR, em amostras coletadas na mesma data (Quadro 2).

## 6.2 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA – MÉTODO CONVENCIONAL

Tradicionalmente a identificação bacteriana nos laboratórios clínicos é realizada utilizando testes fenotípicos incluindo coloração de Gram, testes bioquímicos, perfis de susceptibilidade a antimicrobianos e as exigências nutricionais

e atmosfera requeridas para o crescimento. Mas esses métodos apresentam limitações como a identificação de bactérias raras em amostras clínicas ou com perfis fenotípicos não usuais (WOO *et al.*, 2008).

A identificação de *Aeromonas* ao nível de espécie é problemática devido a similaridade fenotípica de algumas genomoespécies e a heterogeneidade fenotípica dessas bactérias (BORRELL *et al.*, 1997; CARSON *et al.*, 2001; ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003). A identificação bioquímica dessas bactérias requer uma bateria de pelo menos 18 testes, o que provavelmente não é justificável para uso na rotina dos laboratórios clínicos devido ao custo, tempo de incubação para a identificação final (48-72 horas) e a mão de obra envolvida (GHENGESH *et al.*, 2008). Os resultados devem ser interpretados cuidadosamente, e as vezes é difícil obter resultados idênticos nas reações bioquímicas para um mesmo isolado. Além disso, alguns desses testes não são realizados rotineiramente nos laboratórios (ORMEN *et al.*, 2005).

Neste estudo foram utilizados 28 testes fenotípicos para a identificação das estirpes de *Aeromonas* (26 ensaios bioquímicos e a resposta frente aos antibióticos ampicilina e cefalotina, como marcadores de resistência intrínseca) (Figura 5 e Tabela 1). Quatro espécies foram identificadas (*A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar sobria e *A. trota*) e correspondem àquelas detectadas através de PCR-RFLP do gene 16S rDNA (Tabela 6).

Houve apenas uma discordância (1,3%) na identificação entre os dois métodos. Uma estirpe (LACEN-19) identificada pelo método convencional como *A. hydrophila* apresentou perfil de PCR-RFLP idêntico ao de *A. caviae* (Figura 9B). Os ensaios fenotípicos e moleculares foram repetidos e os resultados se mantiveram inalterados.

Análises de sequência do gene 16S rDNA são particularmente úteis na identificação de bactérias raras, que apresentam perfil ambíguo, ou que são difíceis de identificar pelos métodos convencionais. Diferente da identificação fenotípica que pode ser afetada pela presença ou ausência de genes “*não-housekeeping*” ou pela variabilidade na expressão de características, a análise do 16S rDNA é útil na identificação de isolados com características fenotípicas atípicas (JANDA e ABBOTT, 2007; WOO *et al.*, 2008). Geralmente a sequência de aproximadamente 500 pb da extremidade 5' que inclui a região mais variável pode ser adequada para

a identificação de alguns grupos bacterianos, embora a sequência completa seja desejável (WOO *et. al.*, 2008).

As espécies do gênero *Aeromonas* apresentam uma elevada similaridade (98 a 100%) na sequência do gene 16S rDNA. Mas regiões específicas no 16S rDNA descritas por MARTINEZ-MURCIA, BENLLOCH e COLLINS, 1992 permitem diferenciar a maior parte das espécies desse gênero.

O sequenciamento de uma região variável do gene 16S rDNA da estirpe LACEN-19 e a comparação com a mesma região das estirpes de *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. caviae* ATCC 15467 disponíveis no GenBank (Figura 10) sugere que a bactéria pertence à espécie *A. caviae*. Provavelmente a falha na identificação bioquímica se deve a um padrão atípico apresentado por essa estirpe. Entre os testes bioquímicos realizados, três em particular são úteis para diferenciar *A. hydrophila* e *A. caviae*. São eles o teste de VP (Voges-Proskauer) para o qual a positividade é de 92% e 0% respectivamente, para *A. hydrophila* e *A. caviae*; a descarboxilação da L-lisina (LDC) com positividade de 100% e 0% respectivamente para *A. hydrophila* e *A. caviae*; e gás a partir da glucose com 92% e 0% de positividade respectivamente, para *A. hydrophila* e *A. caviae* (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003). O isolado LACEN-19 apresentou resultados positivos nas três provas, como esperado para *A. hydrophila*, junto com resultados compatíveis nos demais ensaios realizados (Tabela 1 e Apêndice 3).

Discrepâncias entre os ensaios bioquímicos e o perfil de PCR-RFLP já foram descritas por alguns autores (BORRELL *et al.*, 1997; ORMEN *et al.* 2005). Borrell e colaboradores encontraram uma situação idêntica à descrita no presente trabalho. O perfil bioquímico da bactéria estudada por aqueles autores incluía os três testes acima citados, e os resultados foram positivos para todos. Isto pode indicar uma diversidade fenotípica maior que a descrita por ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003, para *A. caviae*; a existência de um perfil de PCR-RFLP compartilhado com outra espécie já descrita e não detectado por FIGUERAS *et al.*, 2000, ou ainda que essa estirpe pertença a uma nova espécie de *Aeromonas* ainda mal caracterizada e provavelmente pouco comum como causa de infecção em humanos. O sequenciamento de outros genes *housekeeping* pode auxiliar a esclarecer a situação.

### 6.3 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA – MÉTODO AUTOMATIZADO

Vários sistemas comerciais de identificação bioquímica bacteriana estão disponíveis no mercado, mas o custo é elevado e geralmente não identificam *Aeromonas* corretamente (GHENGESH *et al.*, 2008). Mas esses sistemas comerciais estão sendo cada vez mais empregados nos laboratórios clínicos devido a padronização, facilidade de uso e/ou disponibilidade do resultado em menor tempo e produzem resultados rápidos e acurados para Enterobactérias e alguns outros patógenos.

O desempenho de vários desses sistemas na identificação de *Aeromonas* tem sido reportado na literatura. ABBOTT *et al.*, 1998, utilizando o sistema miniaturizado API 20E observaram um caso de identificação errônea de *A. veronii* biovar *veronii* como *Vibrio cholerae*. E no sistema Vitek a identificação de uma estirpe de *A. schubertii* como *Vibrio damsela*.

Outros sistemas como o BBL Crystal E/NF e o MicroScan W/A também não mostraram desempenho satisfatório, identificando corretamente apenas 20% e 14% de 74 isolados clínicos e estirpes de referência de *Aeromonas* (SOLER *et al.*, 2003).

Com o lançamento do Vitek 2, que utiliza tecnologia baseada na emissão de fluorescência, logo se tornaram disponíveis os resultados de análises realizadas em diferentes laboratórios. FUNKE *et al.*, 1998 testaram 20 estirpes de *Aeromonas*. Relataram que o aparelho identificou corretamente 17 de 19 *A. hydrophila* / *A. caviae*, e para 2 houve “baixa discriminação”; uma estirpe de *A. sobria* foi corretamente identificada.

O’HARA e MILLER, 2003, utilizando o sistema Vitek 2, verificaram que de 10 *Aeromonas* 6 foram corretamente identificadas como *A. hydrophila* / *A. caviae*; de 4 *A. sobria* duas foram corretamente identificadas, para uma houve “baixa discriminação”, e a outra foi erroneamente identificada como *A. hydrophila* / *A. caviae*.

PARK *et al.*, 2003, utilizando o sistema Vitek versão VTK-R07.01 e o cartão GNI+ verificaram a identificação errônea de duas estirpes de *A. veronii* biovar *sobria* como *V. alginolyticus*. Estas informações indicam que existem discrepâncias na identificação bioquímica automatizada das *Aeromonas*.

O desempenho do sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact frente a diversas espécies de bactérias foi analisado por NAKASONE *et al.*, 2007. O tempo médio para a identificação bacteriana foi de 7 horas. A compatibilidade dos resultados em relação às tiras API foi de 95,8% e com testes adicionais a acurácia chegou a 98,3%. O sistema detectou corretamente 97,7% das resistências aos antimicrobianos. Além disso, relataram que as 10 *Aeromonas* analisadas (8 *A. hydrophila* e 2 *A. sobria*) foram corretamente identificadas.

Os resultados obtidos com o VITEK<sup>®</sup> 2 Compact neste trabalho (Tabela 2 e Apêndice 4) indicam a presença das seguintes espécies de *Aeromonas*: *A. caviae* (51 estirpes), *A. hydrophila* (9 estirpes), *A. sobria* (13 estirpes) e *A. veronii* (1 estirpe).

Estes resultados foram obtidos preparando-se o inóculo bacteriano com NaCl 0,85% ao invés de 0,45%, como preconizado pelo fabricante, uma vez que nessa condição duas estirpes de *Aeromonas* foram erroneamente identificadas como *V. vulnificus* e *V. cholerae*. (Quadro 3). Comportamento similar foi detectado por PARK *et al.*, 2003, que sugeriram a utilização de NaCl a 0,85% para solucionar este problema. Entretanto a razão para a identificação errônea de estirpes de *Aeromonas* cujo inoculo foi preparado em NaCl 0,45% é desconhecida.

Cultivos realizados em concentrações variando de 0 a 1,02 M de NaCl indicaram que todas as espécies de *Aeromonas* analisadas foram capazes de crescer entre 0 a 0,34M (aproximadamente 2%) de cloreto de sódio. Curvas de crescimento realizadas em concentrações de 0,08 a 1,02M de NaCl também indicaram que a fase log de crescimento permanece constante (3 horas) nas concentrações de 0,08 e 0,34M e foi alterada para 6 horas em 0,68M de cloreto de sódio (DELAMARE *et al.*, 2000). Assim, foi mostrado que *Aeromonas* são capazes de crescer em várias concentrações de cloreto de sódio. Portanto, a razão para o desempenho bioquímico diferencial em 0,45 e 0,85% permanece desconhecida. Uma possibilidade é que 0,85% de NaCl possa representar a condição ótima para o crescimento e a expressão das características fenotípicas dos patógenos humanos deste gênero.

O sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact mostrou um bom desempenho na detecção das estirpes de *A. hydrophila/A. caviae*, que foram diferenciadas com auxílio de testes convencionais (VP). Foram identificadas 51 estirpes de *A. caviae* como

observado no método convencional, entretanto por PCR-RFLP, 52 estirpes foram encontradas.

Nove estirpes foram identificadas como *A. hydrophila*. Destas, 6 foram confirmadas pelo método convencional e por PCR-RFLP. As outras três foram identificações errôneas do VITEK<sup>®</sup> 2 Compact. Uma delas foi confirmada como *A. caviae* (estirpe LACEN-19) por PCR-RFLP e sequenciamento de DNA. As outras duas estirpes (LACEN-35 e 39) (Tabela 4) foram identificadas como *A. veronii* biovar sobria pelo sistema convencional e confirmadas como *A. veronii* por PCR-RFLP, que não distingue entre as biovariedades sobria e veronii.

O sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact conta com *A. sobria* e *A. veronii* no seu banco de dados. Entretanto não há informação se a primeira se refere à *A. sobria* (GH 7) ou *A. veronii* biovar sobria (GH 10). Provavelmente essas denominações se referem às biovariedades sobria (GH 8) e veronii (GH 10) de *A. veronii*, que são isoladas de amostras clínicas.

Treze estirpes de *A. sobria* foram identificadas pelo sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact. Dez destas correspondem a *A. veronii* biovar sobria pelo sistema convencional e *A. veronii* por PCR-RFLP, como esperado já que não discrimina as biovariedades desta espécie. E as outras três correspondem à *A. trota* pelo sistema convencional e por PCR-RFLP (Tabelas 6 e 7). Mas *A. trota* não está incluída no banco de dados do sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, e os resultados provavelmente refletem o impacto da falta de atualização do software utilizado.

Uma estirpe foi identificada como *A. veronii* pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, mas como *A. veronii* biovar sobria pelo sistema convencional e *A. veronii* por PCR-RFLP (não discrimina as biovariedades dessa espécie).

Em resumo, as sete inconsistências detectadas na identificação bioquímica automatizada foram: *A. caviae* (1 estirpe, LACEN-19) e *A. veronii* biovar sobria (2 estirpes, LACEN-35 e LACEN-37) foram caracterizadas como *A. hydrophila*; *A. trota* (3 estirpes LACEN-02, LACEN-07 e LACEN-94) foram caracterizadas como *A. veronii* biovar sobria (e 2 destas como *Vibrio* em NaCl 0,45%); *A. veronii* biovar sobria (1 estirpe LACEN-70) foi caracterizada como *A. veronii* biovar veronii (Quadro 3 e Tabela 2). Portanto cerca de 10% das estirpes foram identificadas erroneamente. NAKASONE *et al.*, 2007 encontraram 100% de acerto na identificação de *Aeromonas* pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, mas esses autores testaram apenas 10 estirpes.

#### 6.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (PCR-RFLP)

Os genes que codificam os RNAs ribossomais 16S, 23S e 5S são encontrados juntos em operons que são transcritos de modo a produzir quantidades equimolares do produto de cada gene. Vários estudos, compreendendo grupos bacterianos distintos, indicam que o número de operons de rRNA varia de 1 a 17 (KLAPPENBACH *et al.*, 2001; ACINAS *et al.*, 2004). Cerca de 40% das bactérias contém um ou dois operons; e em 25% delas dois operons foram encontrados, representando a classe mais comum. Mas bactérias com até 7 operons são comumente encontradas. Além das variações no número de operons entre diferentes espécies bacterianas, variações entre estirpes da mesma espécie também foram identificadas (ACINAS *et al.*, 2004).

Cerca de quarenta por cento dos operons de bactérias com múltiplos operons de rRNA mostraram sequências idênticas a pelo menos uma sequência de 16S rDNA presente no mesmo genoma. E em 38% dos genomas de bactérias analisados, todas as sequências de 16S rDNA eram completamente conservadas. A maior proporção de sequências totalmente conservadas foi observada entre as bactérias com menor número de operons (ACINAS *et al.*, 2004).

As espécies de *Aeromonas* apresentam um alto nível de similaridade na sequência do gene 16S rDNA, variando de 98 a 100% (MARTINEZ-MURCIA, BENLLOCH e COLLINS, 1992), e contém de 6 a 10 operons de rRNA (MORANDI *et al.*, 2005; SESHADRI *et al.*, 2006).

Em *A. hydrophila*, 10 operons de rRNA estão presentes (SESHADRI *et al.*, 2006). O sequenciamento do 16S rDNA indicou a presença de pelo menos seis diferentes alelos em *A. media* CDC 0862-83 diferindo um do outro em até 19 pb, e pelo menos cinco em *A. veronii* biovar sobria LMG 13695 diferindo em até 21 pb de 1377 pb comparados. Estes dados demonstram a heterogeneidade intragenômica do 16S rDNA em *Aeromonas* e que a diferença entre os genes em uma mesma estirpe varia cerca de 1,5% (UEDA *et al.*, 1999; MORANDI *et al.*, 2005).

Recentemente ALPERI e colaboradores, 2008 mostraram, através de PCR-RFLP, que cerca de 8% das estirpes de *Aeromonas* estudadas produziam um padrão de restrição atípico, impossibilitando a sua identificação. Foi demonstrado que esse comportamento era devido a presença de polimorfismos, ou

microheterogeneidades, nos operons de rRNA. O sequenciamento do 16S rDNA foi realizado e o número de substituições detectado variou de 1 a 10, com média de 5,5 por sequência. Algumas substituições ocorreram nos sítios de reconhecimento das enzimas utilizadas, *AluI* e *MboI*, afetando os resultados. As espécies que apresentaram esse comportamento incluíam *A. caviae*, *A. veronii* e *A. media*. O padrão atípico foi mais frequente entre estirpes isoladas de amostras clínicas do que entre os isolados ambientais. Quatro padrões atípicos foram encontrados entre as estirpes de *A. caviae* e designados 1, 2, 6 e 12. O primeiro foi o padrão predominante.

Neste trabalho, 8 das estirpes identificadas pelo perfil bioquímico como *A. caviae* apresentaram padrões de PCR-RFLP que não eram compatíveis com os descritos por BORRELL *et al.*, 1997, FIGUERAS *et al.*, 2000 para essa espécie. Estes padrões atípicos (Figura 9) são similares aos descritos por ALPERI *et al.*, 2008, entretanto isto deve ser confirmado através de sequenciamento de DNA. A frequência de *Aeromonas* com este comportamento foi de 10,8%, pouco superior ao encontrado por ALPERI *et al.*, 2008, o que pode ser devido ao fato de que a amostra utilizada no presente trabalho só contém isolados clínicos, ou pelo tamanho da amostra, menor que a utilizada por aqueles autores (999 estirpes). O padrão mais comum foi o 1, como também observado por ALPERI *et al.*, 2008.

Estes resultados indicam que a caracterização das *Aeromonas* ainda apresenta dificuldades, e nenhuma das metodologias utilizadas, isoladamente, foi adequada para a identificação em nível de espécie. A metodologia de PCR-RFLP, que apresentou os resultados mais acurados, apresenta limitações tais como a não-discriminação entre as variedades *sobria* e *veronii* de *A. veronii*. Além disso, a microheterogeneidade em operons de rRNA pode dificultar a caracterização dessas bactérias e requerer a análise de outros genes tipo *housekeeping* para definir a identificação.

Outro ponto de dificuldade é em relação a outras espécies menos comuns cuja identificação requer a utilização de um maior número de endonucleases para a sua caracterização como demonstrado por FIGUERAS *et al.*, 2000.

## 6.5 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS – MÉTODOS CONVENCIONAL E AUTOMATIZADO

O comportamento das estirpes de *Aeromonas* frente aos antimicrobianos foi testado utilizando duas metodologias distintas, disco-difusão e crescimento em caldo (cartão AST-GN09). Para o primeiro método a interpretação dos halos de inibição foi realizada de acordo com o CLSI, 2006, e para o último através do software AES.

As seguintes classes de antimicrobianos estavam contempladas em ambos os métodos: Penicilinas, Cefalosporinas, Monobactâmicos, Carbapenêmicos, Aminoglicosídeos, Quinolonas, Nitrofurantoína e Sulfametoxazol / Trimetoprima. Representantes de dois outros grupos de antimicrobianos estavam presentes apenas no teste de disco-difusão.

No teste de disco-difusão foram testados 19 antimicrobianos, enquanto que 21 foram utilizados no teste automatizado.

Os seguintes antimicrobianos estavam presentes nas 2 metodologias: Amicacina, Ampicilina, Aztreonam, Cefazolina, Cefepima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Ciprofloxacino, Imipenem, Levofloxacino, Meropenem, Nitrofurantoina e Sulfametoxazol / Trimetoprima.

Foram testados apenas na metodologia convencional: Ácido Nalidíxico, Amoxicilina / Ácido Clavulânico, Cefalotina, Cefoxitina, Cloranfenicol e Tetraciclina; e apenas na metodologia automatizada: Ampicilina / Sulbactam, Cefotetan, Cefuroxima, Cefuroxima Axetil, Gentamicina, Piperacilina, Piperacilina / Tazobactam e Tobramicina.

A interpretação dos resultados de susceptibilidade do sistema OSIRIS foi similar à realizada pelo sistema convencional.

As *Aeromonas* geralmente apresentam resistência à ampicilina, enquanto que as taxas de resistência aos outros antimicrobianos variam nos diferentes países (GHENGHESH *et al.*, 2008).

Em relação ao comportamento frente à ampicilina, observa-se (Tabela 4) que o método convencional, baseado em disco-difusão, mostrou 100% de resistência a este antimicrobiano para as espécies *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar sobria e *A. caviae*, e 0% para *A. trota*, confirmando as expectativas. Na metodologia automatizada, com exceção das estirpes de *A. trota* (estirpes LACEN-02, 07 e 94,

identificadas como *A. veronii* biovar sobria pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact) que se mostraram suscetíveis a ampicilina, a maioria das *Aeromonas* foi resistente a esse antimicrobiano. Entretanto, 4 estirpes (1 *A. hydrophila* e 3 *A. caviae*) apresentaram resposta intermediária. Este comportamento pode gerar dificuldades na detecção de *Aeromonas*, uma vez que a resistência intrínseca a ampicilina é uma característica importante de algumas das espécies desse gênero.

A resistência a cefalotina também é comum entre as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. trota*, enquanto que *A. veronii* biovar sobria é suscetível (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003). Oitenta e seis por cento das estirpes de *A. hydrophila* apresentaram resistência a este antimicrobiano e as 14% restantes uma resposta intermediária. Oitenta e oito por cento da *A. caviae* mostraram resistência, 4% resposta intermediária e 8% foram suscetíveis. Portanto, nem todas as estirpes de *A. caviae* se mostraram resistentes a cefalotina, diferente do que foi descrito por ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003. Isto pode ser devido a diferenças nas estirpes isoladas em regiões geográficas distintas, uma vez que essas bactérias foram confirmadas como *A. caviae* através de PCR-RFLP. Cem por cento das *A. trota* foram resistentes a cefalotina enquanto que 100% das *A. veronii* biovar sobria se mostraram suscetíveis. Esse comportamento está de acordo com o descrito na literatura (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003; HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007). A cefalotina não faz parte do cartão AST-GN09.

Para *A. caviae* diversos perfis de resistência foram detectados (Tabela 4 e Apêndice 5). O mais comum foi a resistência aos antimicrobianos ampicilina, cefalotina e cefazolina observada em 20 estirpes (39%). Entretanto tal resultado não é preocupante pois segundo ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003 e HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007, a resistência dessa espécie a cefalotina é comum. O comportamento frente a cefazolina, antimicrobiano que pertence ao mesmo grupo que a cefalotina (cefalosporinas de 1<sup>a</sup> geração) é variável (HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007).

Outros perfis encontrados entre estirpes de *A. caviae* associam a resistência a ampicilina a um ou mais antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos como cefalotina, cefazolina e cefoxitina (4 estirpes); cefalotina, cefazolina, cefoxitina, amoxicilina/ácido clavulânico (1 estirpe). Resistência a múltiplos antimicrobianos também foi observada e inclui a resistência a ampicilina, cefalotina, cefazolina, sulfametoxazol/trimetoprima, ácido nalidíxico e tetraciclina ou ampicilina, cefalotina,

cefazolina, cefoxitina, sulfametoxazol/trimetoprima, amoxicilina/ácido clavulânico (1 estirpe cada). Outras estirpes multi-resistentes também foram identificadas.

Entre as estirpes de *A. veronii* biovar sobria também foi observada, além da ampicilina, a resistência a cefazolina; tetraciclina; cefazolina e amoxicilina/ácido clavulânico; ácido clavulânico e tetraciclina (1 estirpe cada). A estirpe LACEN-95, isolada do sangue, mostrou resistência apenas a ampicilina e tetraciclina.

Em *A. hydrophila*, além da resistência a ampicilina também foi observada resistência a cefalotina e cefazolina (2 estirpes), cefalotina, cefazolina e ácido nalidíxico (1 estirpe), cefalotina, cefazolina e amoxicilina/ácido clavulânico (2 estirpes), cefazolina e amoxicilina/ácido clavulânico (1 estirpe), cefalotina, cefazolina, amoxicilina/ácido clavulânico e cefoxitina (1 estirpe).

As 3 estirpes de *A. trota*, como esperado, foram suscetíveis a ampicilina e resistentes a cefalotina como descrito por ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003, e mostraram também resistência a cefazolina.

A resistência de *Aeromonas* a cefoxitina, cefazolina, tetraciclina, ácido nalidíxico, cloranfenicol e sulfametoxazol/trimetoprima já foi descrita no país (GUERRA *et al.*, 2007; GHENGHESH *et al.*, 2008).

Em relação ao VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, houve discordância nos perfis de resistência em relação ao observado no método de disco-difusão (Tabelas 4 e 5, Apêndices 5 e 6), especialmente considerando-se as respostas a cefazolina. No primeiro método em geral a taxa de resistência foi menor, o que pode ser decorrente do menor tempo para a emissão do resultado (cerca de 8 horas) ao passo que no método convencional são necessárias ao menos 16 horas de incubação. Por outro lado, para a estirpe MS-90, o sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact indicou resistência ao aztreonam, cefepime, imipenem e meropenem, piperacilina/tazobactam, piperacilina, ampicilina/sulbactam, ampicilina, cefazolina, ceftazidima além da nitrofurantoína. A resistência as penicilinas, cefamicinas e cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração, e ainda aos carbapenems, sugere o envolvimento simultâneo de múltiplos mecanismos de resistência tais como a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), AmpC, Metallo-beta lactamases. NAKASONE *et al.*, 2007 mostraram que esse sistema apresenta boa acurácia (98%) na detecção de fenótipos de resistência tais como a produção de ESBL.

O teste de disco-difusão da estirpe MS-90 foi repetido, e os resultados foram confirmados indicando que a mesma apresenta resistência apenas aos antimicrobianos ampicilina, cefalotina, cefazolina e sulfametoxazol/trimetoprima.

Embora a produção de beta-lactamases seja comum entre as *Aeromonas*, a sua produção pode não ser detectada pelo antibiograma convencional (HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007), requerendo testes especiais. Dessa forma, o perfil de resistência da estirpe MS-90 permanece indefinido. Ensaio fenotípicos para a detecção de beta-lactamases deverão ser realizados para definir o comportamento dessa estirpe frente aos beta-lactâmicos.

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos poderão ser úteis para auxiliar na seleção empírica da terapia para o tratamento de infecções causadas por *Aeromonas* nesta região geográfica.

## 7 CONCLUSÕES

7.1 Quatro espécies de *Aeromonas* foram isoladas de amostras humanas no Estado do Paraná no período de 1999 a 2009: *A. caviae* (70,3%), *A. veronii* biovar sobria (17,6%), *A. hydrophila* (8,1%) e *A. trota* (4%).

7.2 A identificação bioquímica convencional identificou corretamente 98,6% (73/74) das estirpes em comparação com a identificação molecular por PCR-RFLP.

7.3 O sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact identificou erroneamente 02 estirpes de *A. trota* como *Vibrio*. Esta falha foi corrigida com o uso de NaCl 0,85% para o preparo do inóculo.

7.4 A identificação bioquímica automatizada obteve 90,5% (67/74) de identificações corretas.

7.5 Uma estirpe de *Aeromonas* (LACEN-19) apresentou perfil bioquímico não usual e foi identificada como *A. hydrophila* pelos testes convencionais e automatizado e como *A. caviae* por PCR-RFLP e pelo sequenciamento do gene 16S rDNA.

7.6 Oito estirpes de *A. caviae* apresentaram padrão de PCR-RFLP atípico.

7.7 O método que apresentou os melhores resultados foi o PCR-RFLP. Entretanto o número de espécies analisadas foi limitado, e os resultados gerados por esse método podem ser alterados pela presença de microheterogeneidades no 16S rDNA.

7.8 Foi observada diferença entre os perfis de resistência aos antimicrobianos liberados pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact e aqueles obtidos pelo método de disco-difusão.

7.9 Com exceção da ampicilina, cefalotina e cefazolina, a maioria das *Aeromonas* (54%) foi suscetível aos demais antimicrobianos testados.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, S. L. *et al.* Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36, n.4, p.1103-1104, 1998.
- ABBOTT, S. L.; CHEUNG, W. K. W.; JANDA, J. M. The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, n.6, p.2348-2357, 2003.
- ACINAS, S. G. *et al.* Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. **Journal of Bacteriology**. v.186, n.9, p.2629-2635, 2004.
- AGUILAR, A. *et al.* Two genes from the capsule of *Aeromonas hydrophila* (serogroup O:34) confer serum resistance to *Escherichia coli* K12 strains. **Research in Microbiology** v.150, p.395-402, 1999.
- ALBERT, M.J. *et al.* Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. Isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.10, p.3785-3790, 2000.
- ALPERI, A. *et al.* Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. **International Microbiology**. v.11, p.185-194, 2008.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.
- AOYAGI, M. *et al.* A novel method for the diagnosis of drowning by detection of *Aeromonas sobria* with PCR method. **Legal Medicine**, n.11, p.257-259, 2009.
- AL-BENWAN, K. *et al.* Cystitis caused by *Aeromonas caviae*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.45, n.7, p.2348-2350, 2007.
- BORRELL, N. *et al.* 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.
- CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Proposed guideline. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, M45-P, v.25, n.26, 2006.
- CARSON, J. *et al.* Miniaturized tests for computer-assisted identification of motile *Aeromonas* species with an improved probability matrix. **Journal of Applied Microbiology**. n.90, p.190-200, 2001.

CASCÓN, A *et al.* A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**. v.68, n.6, p.3233–3241, 2000.

CHEN, J-R. *et al.* Rapid identification and susceptibility testing using the VITEK<sup>®</sup> 2 system using culture fluids from positive BacT/ALERT<sup>®</sup> blood cultures. **The Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. v.41, p.259-264, 2008.

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

DELAMARE, A. P. L. *et al.* Growth of *Aeromonas* species on increasing concentrations of sodium chloride. **Letters in Applied Microbiology**. n.30, p.57-60, 2000.

DELMAS, J. *et al.* Evaluation of the Vitek 2 System with a variety of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v.46, n.1, p.311-313, 2008.

DEMARTA, A. *et al.* *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. **Systematic and Applied Microbiology**. v.1, n.4, p.278-286, 2008.

DEODHAR, L. P., SARASWATHI, K., VARUDKAR, A. *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. **Journal of Clinical Microbiology** v.29, n.5, p.853-856, 1991.

DSMZ. Bacterial nomenclature up-to-date (approved lists, validations lists – November 2009). **DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH**. Braunschweig, Alemanha.

Disponível em <<http://www.dsmz.de/download/bactnom/bactname.pdf>> Acesso em 25 de Novembro de 2009.

FANG, H. M *et al.* Cloning, characterization and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesion. **Fish & Shellfish Immunology** v.16, p.645–658, 2004.

FARMER III, J.J; ARDUINO, M. J.; HICKMAN-BRENNER, S. W. The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. **The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria**. ed.3, v.6, p.564-596, 2006.

FIGUERAS, M. J. *et al.* Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.50, p.2069-2073, 2000.

FIGUERAS, M. J.; ALPERI, A.; GUARRO, J. On the identification of clinical *Aeromonas* by a new restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA method. **Letters in Applied Microbiology**. v.45, p.692-693, 2007.

FUNKE, G. *et al.* Evaluation of the VITEK 2 System for rapid identification of medically relevant gram-negative rods. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36, n.7, p.1948-1952, 1998.

GALINDO, C. L. *et al.* Host immune responses to *Aeromonas* virulence factors. **Currente Immunology Reviews**. v.2, p.13-26, 2006.

GIBOTTI, A. *et al.* Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non-O1, *Aeromonas* spp. And *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambé stream (State of Paraná, Brazil). **Journal of Applied Microbiology**. v.89, p.70-75, 2000.

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. *et al.* *Aeromonas*-associated infections in developing countries. **Journal of Infection in Developing Countries** v.2, n.2, p.81-98, 2008.

GRAF, J. Diverse restriction fragment length polymorphism patterns of the PCR-amplified 16S rRNA genes in *Aeromonas veronii* strains and possible misidentification of *Aeromonas* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, n.10, p.3194-3197, 1999.

GUERRA, I. M. *et al.* *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in South Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, p.638-643, 2007.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analyses program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. v.41, p.95-98, 1999.

HOFER, E. *et al.* Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarreica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.2, n.39, p.217-220, 2006.

HORNEMAN, A. J.; ALI, A.; ABBOTT, S. L. *Aeromonas*. In MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology Press:Washington D.C., 9ed., v.1, p.716-721, 2007.

HUYS, G. *et al.* *Aeromonas hydrophila* subsp. dhakensis subsp. nov., isolated from children with diarrhoea in Bangladesh, and extended description of *Aeromonas hydrophila* subsp. hydrophila (Chester 1901) Stainer 1943 (approved lists 1980). **International**. v.52, p.705-712, 2002.

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

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**. v.2, p.332-344, 1998.

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

JOSEPH, S.W.; CARNAHAN, A.M. Update on the genus *Aeromonas*. **ASM News**. v.66, n.4. p.218-223, 2000.

KHAN, A. M. *et al.* Bacterial enteropathogens of neonates admitted to an urban diarrhoeal hospital in Bangladesh. **Journal of Tropical Pediatrics** v.55, n.2, p.122-124, 2009.

KIROV *et al.* Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. **Journal of Bacteriology**. v.184, n.2, p.547-555, 2002.

KLAPPENBACH, J. A. *et al.* rrndb: the ribosomal RNA operons copy number database. **Nucleic Acids Research**. v.29, n.1, p.181-184, 2001.

KNUDSEN, B. *et al.* CLC *Main Workbench*, version 5.6, build 5606, desarrollado por CLC bio, 2009.

KÜHN, I. *et al.* Diversity, persistence, and virulence of *Aeromonas* strains isolated from drinking water distribution systems in Sweden. **Applied and Environmental Microbiology**. v.63, n.7, p.2708-2715, 1997.

LERNER, K. L.; LERNER B. W. Antibiotics. **World of Microbiology and Immunology**. Ed. Thompsom Gale, Farmington Hills, MI: v.1, p.24-25, 2003.

LIBISCH *et al.* Identification of the first VIM metallo- $\beta$ -lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain. **Journal of Clinical Microbiology**. v.46, n.5, p.1878-1880, 2008.

MARTINEZ-MURCIA, A. J.; BENLLOCH, S.; COLLINS, M. D. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: Lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.42, n.3, p.412-421, 1992.

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S.W. *Aeromonas*. In BRENNER, D. J. *et al.* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**., Nova lorque, EUA: Springer, v.2, parte B, p.556-578, 2005.

MERINO, S. *et al.* Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**. v.28, p.157-168, 1995.

MORANDI, A. *et al.* Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. **Journal of Bacteriology**. v.187, n.18, p.6561-6564, 2005.

NAKASONE, I. *et al.* Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact System for species identification and of the Advanced Expert System for

detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 Compact system identification and antimicrobial susceptibility testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.58, p.191-198, 2007.

NEUWIRTH *et al.* First occurrence of an IMP metallo- $\beta$ -lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v.51, n.12, p.4486-4488, 2007.

NOGIMOTO, I. T. *et al.* Prevalência de *Aeromonas* spp. em fezes diarréicas de crianças menores de 5 anos de idade na cidade de Goiânia, Goiás, no biênio 1995-1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.5, n.30, p.385-388, 1997.

NOONAN, B.; TRUST, T.J. The synthesis, secretion and role in virulence of the paracrystalline surface protein layers of *Aeromonas salmonicida* and *A. hydrophila*. **FEMS Microbiology Letters** v.54, p.1-7, 1997.

OLSVIK, O.; STROCKBINE, N. A. PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. **Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications**, p.271-6, 1993.

O'HARA, C. M.; MILLER, J. M. Evaluation of the Vitek 2 ID-GNB assay for identification of members of the family *Enterobacteriaceae* and other nonenteric gram-negative bacilli and comparison with the Vitek GNI+ card. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, n.5, p.2096-2101, 2003.

O'HARA, C. M. Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic gram-negative bacilli. **Clinical Microbiology Reviews**. v.18, n.1, p.147-162, 2005.

O'HARA, C. M. Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST System and NID Panel for identification of *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, and commonly isolated nonenteric gram-negative bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**. v.44, n.3, p.928-933, 2006.

ORMEN, O *et al.* Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. n.113, p.203-207, 2005.

PARK *et al.*, 2003; Misidentification of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* as *Vibrio alginolyticus* by the Vitek system. **Letters in Applied Microbiology** v.37, p.349-353, 2003.

PERCIVAL, S. *et al.* *Aeromonas*. **Microbiology of waterborne diseases**. Ed: Elsevier Academic Press, Londres, UK, p.30-41, 2004.

PRESCOTT, L. M.; **Microbiology. Appendix IV: Classification of Prokaryotes according to the Second Edition of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Ed. The McGraw-Hill Companies, ed.5, 2002.

PUND, R. P.; THEEGARTEN, D. Die bedeutung der beweglichen Aeromonaden als krankheitserreger für den menschen. **Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz**. v.51, n.5, p.569-576, 2008.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial pathogenesis. A molecular approach**. 2.ed. ASM Press, Whashington, D.C., 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3 ed. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EUA. 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.

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.

SESHADRI, R. *et al.* Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup>: Jack of all trades. **Journal of Bacteriology**. v.188, n.23, p.8272-8282, 2006.

SHA, J.; KOZLOVA, E. V.; CHOPRA, A. K. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. **Infection and Immunity**. v.70, n.4, p.1924-1935, 2002.

SHA, J. *et al.* Further characterization of a type III secretion system (T3SS) and of a new effector protein from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. Part I. **Microbial Pathogenesis**. v.43, p.127-146, 2007.

SINHA, S. *et al.* Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. **Journal of Medical Microbiology**. v.53, p.527-534, 2004.

SOLER, L. *et al.* Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, n.12, p.5732-5734, 2003.

SOLER, L. *et al.* Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.54, p.1511-1519, 2004.

SUAREZ, G. *et al.* Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**. v.44, p.344-361, 2008.

SUREK, M. Estudo prospectivo para a detecção de *Aeromonas* e *Plesiomonas* de amostras fecais de pessoas sintomáticas e controles saudáveis, **Monografia de especialização – Universidade Federal do Paraná UFPR**, Curitiba/PR, 2008.

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

TAO, C. *et al.* Microbiologic study of the pathogens isolated from wound culture among Wenchuan earthquake survivors. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v.63, p.268-270, 2009.

TENA, D. *et al.* Infección extraintestinal por *Aeromonas* spp. : revisión de 38 casos. **Enferm Infecc Microbiol Clin** v.25, n.4, p.235-241, 2007.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.

TRAKHNA, F. *et al.* Rapid *Aeromonas hydrophila* identification by TaqMan PCR assay: comparison with a phenotypic method. **Letters in applied microbiology**, n.49, p.186-190, 2009.

TSAI, Y. H. *et al.* Fatal Necrotizing Fasciitis Caused by *Aeromonas sobria* in Two Diabetic Patients. **Clinical Orthopaedics and Related Research** v.467,846–849, 2009.

UEDA, K. *et al.* Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. **Journal of Bacteriology**. v.181, n.1, p.78-82, 1999.

VILA, J. *et al.* *In vitro* antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.49, p.697-702, 2002.

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

VON GRAEVENITZ, A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. **Infection**. v.35, n.2, p.59-64, 2007.

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.

WOO, P. C. Y. *et al.* Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**. v.14, n.10, p.908-934, 2008.

XU, X.J. *et al.* Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: development of transposon and isogenic mutants. **Infection and Immunity**. v.66, n.8, p.3501–3509, 1998.

YU, H. B. *et al.* A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. **Infection and Immunity**. v.72, n.3, p.1248-1256, 2004.

YU, H. B. Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. **Applied and Environmental Microbiology** v.71, n.8, p.4469–4477, 2005.

ZHANG, Y. L. *et al.* Detection and genetic analysis of group II capsules in *Aeromonas hydrophila*. **Microbiology** v.149, p.1051–1060, 2003.

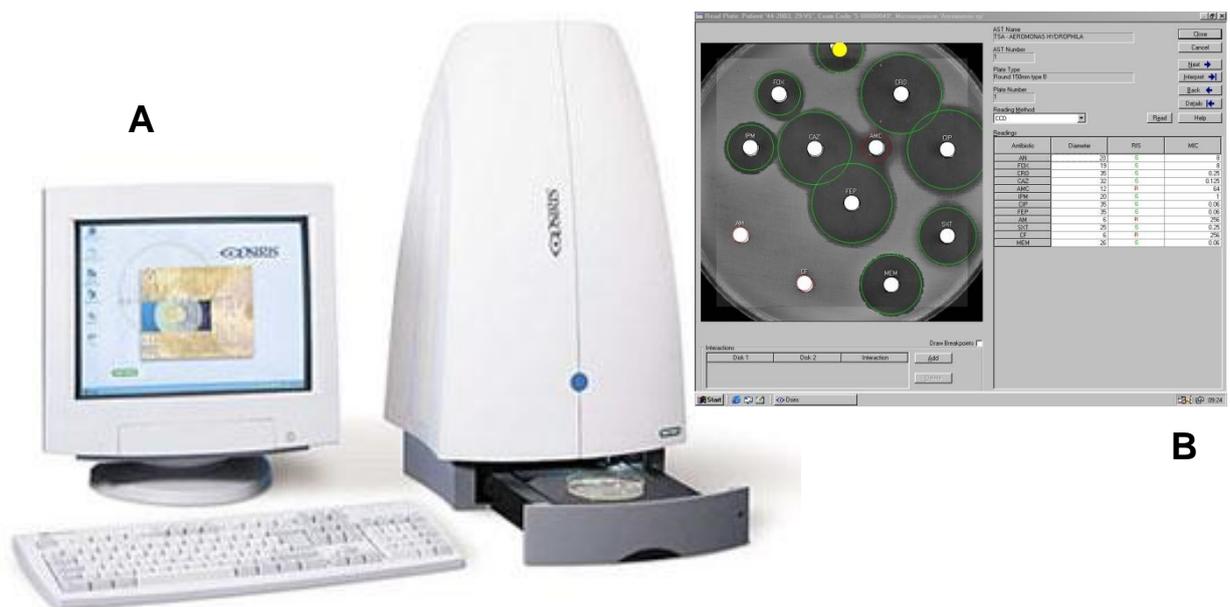
## APÊNDICES

<b>APÊNDICE 1 - SISTEMA OSIRIS™ (Bio-Rad)</b> .....	79
<b>APÊNDICE 2 – SISTEMA AUTOMATIZADO DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E ANTIBIOGRAMA VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Inc.)</b> .....	80
2.1 - CARTÕES GN E AST-GN09 VITEK® 2 Compact.....	81
2.2 - INSTRUMENTOS E MATERIAIS.....	84
2.3 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO E TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	84
2.4 - INTERPRETAÇÃO.....	85
<b>APÊNDICE 3 - IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA CONVENCIONAL DAS ESTIRPES DE AEROMONAS</b> .....	88
<b>APÊNDICE 4 - IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA DAS ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i> REALIZADO PELO SISTEMA VITEK® 2 Compact</b> .....	91
<b>APÊNDICE 5 - TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DAS ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i> AVALIADO PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO</b> .....	96
<b>APÊNDICE 6 - TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS AUTOMATIZADO DAS ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i>, AVALIADO PELO SISTEMA VITEK® 2 Compact</b> .....	99

## APENDICE 1 - SISTEMA OSIRIS™ (Bio-Rad)

O sistema Osiris™ (Figura 11) é um dispositivo capaz de realizar a leitura e interpretação dos halos de inibição presentes no teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Para isso, conta com um dispositivo de captura de imagem que fotografa a placa de petri e mede o tamanho da zona de inibição ao redor dos discos de antimicrobianos e um software de administração de dados que realiza a interpretação das medidas dos halos e fornece o padrão de sensibilidade.

**FIGURA 11** – SISTEMA OSIRIS™ (Bio-Rad) DE LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS HALOS DE INIBIÇÃO DOS TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS



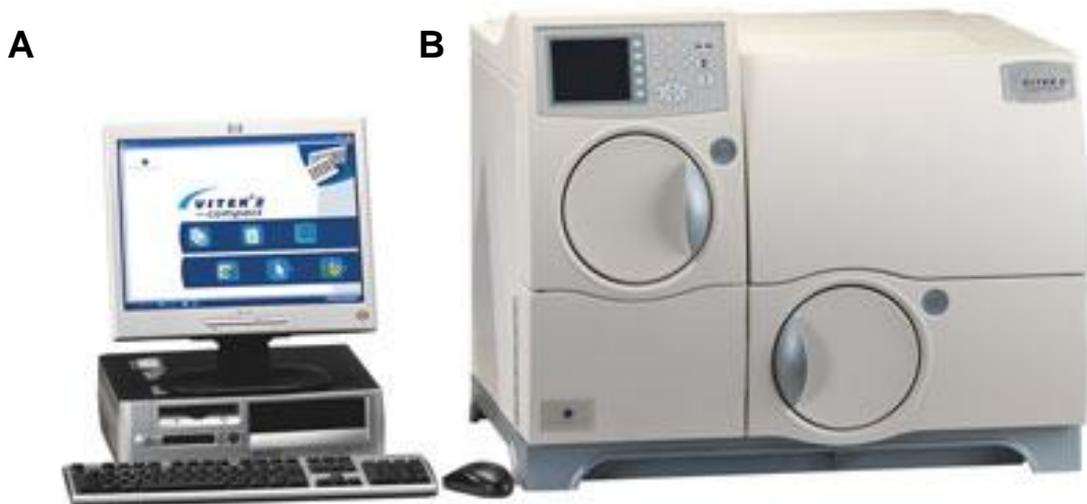
FONTE: <<http://www3.bio-rad.com>>

NOTA: **A.** Microcomputador acoplado ao dispositivo de captura de imagem **B.** Tela do software de administração de dados durante análise dos halos de inibição.

## APÊNDICE 2 - SISTEMA AUTOMATIZADO DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E ANTIBIOGRAMA VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Inc.)

O equipamento VITEK® 2 Compact (Figura 12), sistema de identificação microbiana desenvolvido pela empresa francesa bioMérieux, Inc. realiza a identificação automatizada e o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos de aproximadamente 300 micro-organismos.

FIGURA 12 – SISTEMA VITEK® 2 Compact



FONTE: <<http://laboratoriumluxmed.pl/contents/read/content/29>>

NOTA: **A.** Microcomputador compoendo a estação de trabalho (*workstation*) **B.** Câmara de incubação.

Sua plataforma de trabalho é composta por 3 sistemas:

1 – a câmara de incubação, onde os cartões de identificação e de suscetibilidade são incubados e analisados utilizando a tecnologia de transmissão óptica que monitora o crescimento e a atividade do micro-organismo dentro dos cartões teste;

2 - a estação de trabalho (*workstation*), composta por um microcomputador equipado com software baseado em Windows que gerencia os resultados gerados pelo equipamento, oferecendo recomendações terapêuticas e validação dos

resultados utilizando o sistema patenteado pela bioMérieux chamado “AES” (*Advanced Expert System*);

3 - e a estação de trabalho gerenciadora de dados chamada “OBSERVA”, composta por um segundo microcomputador que facilita o compartilhamento dos resultados entre o sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact e o sistema de informação utilizado pelo laboratório clínico.

## 2.1 CARTÕES GN E AST-GN VITEK<sup>®</sup> 2 Compact

O sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact utiliza a tecnologia colorimétrica de leitura de provas miniaturizadas, distribuídas em um cartão plástico (Figura 13) composto por 64 micro-poços contendo substratos liofilizados, para realizar a identificação bioquímica automatizada dos micro-organismos. Estes medem a utilização da fonte de carbono, a atividade enzimática e a resistência do micro-organismo, compreendendo um total de 47 provas bioquímicas (Quadro 4) e um poço de controle negativo utilizado como referência do valor de base para os poços do teste de descarboxilase. Os substratos liofilizados são dissolvidos pela adição de 30 ul da suspensão bacteriana.

**FIGURA 13** – CARTÃO GN DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA VITEK<sup>®</sup> 2 Compact.



**QUADRO 4 – CONTEÚDO DOS POÇOS DO CARTÃO GN VITEK® 2 Compact**

Poço <sup>1</sup>	Sigla	Teste	Qtde / poço (mg) <sup>2</sup>
2	APPA	Ala-Fe-Pro ARILAMIDASE	0,0384
3	ADO	Adonitol	0,1875
4	PyrA	L-Pirrolidonil-ARILAMIDASE	0,018
5	IARL	L-ARABITOL	0,3
7	dCEL	D-CELOBIOSE	0,3
9	BGAL	BETA-GALACTOSIDASE	0,036
10	H2S	Produção de H2S	0,0024
11	BNAG	BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASE	0,0408
12	AGLTp	Glutamil Arilamidase pNA	0,0324
13	dGLU	D-GLUCOSE	0,3
14	GGT	GAMA-GLUTAMIL-TRANSFERASE	0,0228
15	OFF	FERMENTAÇÃO/GLUCOSE	0,45
17	BGLU	BETA-GLUCOSIDASE	0,036
18	dMAL	D-MALTOSE	0,3
19	dMAN	D-MANITOL	0,1875
20	dMNE	D-MANOSE	0,3
21	BXYL	BETA-XILOSIDASE	0,0324
22	BAlap	BETA-Alanina arilamidase pNA	0,0174
23	ProA	L-Prolina Arilamidase	0,0234
26	LIP	LIPASE	0,0192
27	PLE	PALATINOSE	0,3
29	TyrA	Tirosina ARILAMIDASE	0,0276
31	URE	UREASE	0,15
32	dSOR	D-SORBITOL	0,1875
33	SAC	SACAROSE/SUCROSE	0,3
34	dTAG	D-TAGATOSE	0,3
35	dTRE	D-TREALOSE	0,3
36	CIT	CITRATO (SÓDIO)	0,054
37	MNT	MALONATO	0,15
39	5KG	5-QUETO-D-GLUCONATO	0,3
40	ILATk	Alcalinização L-LACTATO	0,15
41	AGLU	ALFA-GLUCOSIDASE	0,036
42	SUCT	Alcalinização SUCINATO	0,15
43	NAGA	Beta-N-ACETIL-GALACTOSAMINIDASE	0,0306
44	AGAL	ALFA-GALACTOSIDASE	0,036
45	PHOS	FOSFATASE	0,0504
46	GlyA	Assimilação Glicina ARILAMIDASE	0,012
47	ODC	ORNITINA DESCARBOXILASE	0,3
48	LDC	LISINA DESCARBOXILASE	0,15

CONTINUA

## CONCLUSÃO

52	0DEC	BASE DESCARBOXILASE	NA
53	IHISa	Assimilação L-HISTIDINA	0,087
56	CMT	CUMARATO	0,126
57	BGUR	BETA-GLUCORONIDASE	0,0378
58	O129R	RESISTÊNCIA O/129 (comp.vibro.)	0,0105
59	GGAA	Glu-Gli-Arg-ARILAMIDASE	0,0576
61	IMLTa	Assimilação L-MALATO	0,042
62	ELLM	ELLMAN	0,03
64	ILATa	Assimilação L-LACTATO	0,186

NOTA: 1. Alguns poços encontram-se vazios 2. Quantidade do substrato liofilizado por poço em miligramas.

O cartão AST-GN09 é usado para determinar a susceptibilidade da maior parte dos bacilos gram-negativos de relevância clínica frente aos antimicrobianos.

Da mesma forma que o cartão GN, o cartão AST-GN09 é composto por 64 micropoços em uma base plástica que contém quantidade de antimicrobianos em concentrações variadas e na forma liofilizada (Quadro 5), sendo um dos poços utilizado para controle realizando a leitura das provas miniaturizadas através da tecnologia colorimétrica.

**QUADRO 5 – CONTEÚDO DOS POÇOS DO CARTÃO AST-GN09 VITEK® 2 Compact.**

Antimicrobiano	Concentração (µg/ml)	Intervalo de CIM <sup>1</sup> (µg/ml)	
		≤	≥
Amicacina	8, 16, 64	2	64
Ampicilina	4, 8, 32	2	32
Ampicilina + Sulbactam	4/2, 16/8, 32/16	2/1	32/16
Aztreonam	2, 8, 32	1	64
Cefazolina	4, 16, 64	4	64
Cefepime	2, 8, 16, 32	1	64
Cefotetan	2, 8, 32	4	64
Ceftazidima	1, 2, 8, 32	1	64
Ceftriaxona	1, 2, 8, 32	1	64
Cefuroxima	2, 8, 32	1	64
Ciprofloxacina	0.5, 2, 4	0.25	4
Gentamicina	4, 16, 32	1	16
Imipenem	2, 4, 16	1	16
Levofloxacina	0.5, 4, 8	0.25	8
Meropenem	0.5, 4, 16	0.25	16
Nitrofurantoína	16, 32, 64	16	512
Piperacilina	4, 16, 64	4	128
Piperacilina/Tazobactam	4/4, 16/4, 128/4	4/4	128/4
Tobramicina	8, 16, 64	1	16
Sulfametoxazol/Trimetoprima	0.5/9.5, 2/38, 16/304	20(1/19)	320(16/304)

NOTA: 1. CIM=Concentração inibitória mínima.

## 2.2 INSTRUMENTOS E MATERIAIS

O Sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact é constituído por uma variedade de componentes que incluem:

- A câmara incubadora;
- Os cassetes de suporte aos cartões e tubos teste;
- Códigos de barras para identificação dos cassetes;
- Caixa coletora de dejetos;
- O carrossel de suporte para incubação dos cartões;
- Cartão GN e AST-GN VITEK<sup>®</sup> 2;
- DensiChek<sup>™</sup> (equipamento digital para detecção de escala de McFarland)

A estação de trabalho é composta por :

- Microcomputador PC, com os softwares necessários instalados, acompanhado por teclado, mouse, impressora e nobrake
- Scanner portátil de código de barras;

O instrumental para processamento das amostras é composto por:

- 2 pipetas de volume fixo;
- dispensador para salina;
- tubos transparentes de poliestireno de 12x75 mm;
- kit padrão de calibração do DensiChek<sup>™</sup>;
- microrganismos para controle de qualidade;
- e um frasco contendo solução salina 0,45%.

## 2.3 MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO E TÉCNICAS ANALÍTICAS

A cada 15 minutos os poços são lidos por um sensor em um comprimento de onda de 430 nm. O desenvolvimento do micro-organismo durante o período de incubação causa mudanças na transmitância. Para cada leitura as medições são realizadas automaticamente, em cada poço, em 16 pontos diferentes e em 3 vezes

consecutivas (total de 48 pontos de aquisição). O algoritmo de interpretação dos testes permite a obtenção de um perfil bioquímico, que é comparado com um banco de dados, onde é determinado o gênero e a espécie com o perfil mais semelhante ao dos resultados observados.

A identificação de um micro-organismo utilizando o Sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact é realizada através de uma metodologia baseada nas características dos dados e no conhecimento sobre o micro-organismo e as reações que foram analisadas. Dados suficientes das espécies dos micro-organismos mais conhecidos foram reunidos para estimar as reações típicas das espécies em questão em um conjunto de compostos bioquímicos de diferenciação. Se não for reconhecido um padrão único de identificação, uma lista de possíveis micro-organismos é fornecida, ou a estirpe é determinada como estando fora da capacidade de identificação do banco de dados.

## 2.4 INTERPRETAÇÃO

Através da comparação dos resultados do banco de dados com os resultados da identificação obtida pelo equipamento, a identificação final do micro-organismo é classificada em 6 categorias, como mostrado no Quadro 6. O laudo impresso contém sugestões quanto a testes suplementares necessários para completar a identificação. Se os testes não forem suficientes para tal, devem ser consultadas as referências microbiológicas padrão e a literatura. Se um único gênero for identificado, isso corresponderá à identificação final do micro-organismo. Se a identificação final for duvidosa, um resultado de “fraca discriminação/Slashline” ou “micro-organismo não identificado” é impresso no laudo final. Os comentários sobre a identificação são fornecidos no laudo na forma de probabilidade.

**QUADRO 6 – MENSAGENS DE QUALIFICAÇÃO DO CARTÃO GN VITEK® 2 Compact.**

<b>Categoria</b>	<b>Porcentagem de probabilidade</b>
Excelente	96 - 99
Muito Bom	93 - 95
Bom	89 - 92
Aceitável	85 - 88
Fraca discriminação	2 ou 3 taxons apresentam o mesmo biopadrão (necessário separar por testes suplementares)
Micro-organismo não identificado	> 3 taxons apresentam o mesmo biopadrão, ou o isolado possui um padrão muito atípico e nenhuma escolha é possível.

A interpretação do antibiograma é realizada através da avaliação do padrão de crescimento do micro-organismo na presença de antibióticos e em relação ao crescimento no poço de controle. Vários parâmetros baseados nas características de crescimento observadas são utilizados para fornecer dados apropriados para o cálculo da CIM. A análise de discriminação é utilizada para elaborar o algoritmo que determina o resultado de sensibilidade para todos os antibióticos no sistema VITEK® 2 Compact. O resultado da CIM deve ser associado á identificação do micro-organismo de forma a determinar uma interpretação de categoria.

A Figura 14 ilustra os passos necessários para realizar a identificação automatizada dos micro-organismos no sistema VITEK® 2 Compact.

**FIGURA 14 – FLUXOGRAMA DE ANÁLISE DAS AMOSTRAS NO SISTEMA AUTOMATIZADO DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E ANTIBIOGRAMA VITEK® 2 Compact**



NOTA: **A.** Estação de trabalho, onde as amostras são cadastradas utilizando o Software Observa **B.** Após subcultivo em meios de cultura apropriados, para realizar a identificação com o cartão GN, é feita uma suspensão com algumas colônias de mesma morfologia utilizando 3,0 ml de salina 0,45% em tubos de poliestireno, até alcançar uma densidade de 0,5 a 0,63 da escala de MacFarland com auxílio do DensiChek™. Para realizar o teste de suscetibilidade utilizando o cartão AST-GN, uma suspensão é preparada em 3 ml de salina 0,45% em uma densidade de 0,5 a 0,65 da escala de MacFarland, e deste é feita uma diluição transferindo-se 145 µl para outro tubo contendo 3 ml de salina. Este segundo tubo juntamente com o tubo do cartão GN são então inseridos no cassete **C.** Os cartões GN e/ou AST-GN são scaneados e inseridos no cassete **D.** O número de identificação das amostras é scaneado ou digitado diretamente no sistema Observa **E.** O cassete contendo os cartões e os inoculos é inserido na câmara de enchimento, onde um sistema á vácuo transfere o inoculo através do tubo de transferência para os 64 poços nos cartões teste **F.** Após, o cassete é inserido na câmara de carregamento e incubação, onde os tubos de transferência são cortados e selados e os cartões transferidos dos cassetes para o carrossel no interior da câmara de incubação **G.** Os resultados são impressos automaticamente quando a análise é terminada **H.** Os cartões terminados são automaticamente desprezados em um compartimento de descarte após a leitura.

FONTE: <<http://216.62.91.163/industry/watertesting/vitek2compact/vitek2workflow.htm>>



### APÊNDICE 3 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA CONVENCIONAL DAS ESTIRPES DE *Aeromonas*.

Espécies	<i>A. caviae</i> (n=51)																									
	LACEN-04	LACEN-06	LACEN-08	LACEN-09	LACEN-10	LACEN-11	LACEN-14	LACEN-18	LACEN-22	LACEN-23	LACEN-25	LACEN-29	LACEN-31	LACEN-32	LACEN-42	LACEN-43	LACEN-45	LACEN-46	LACEN-47	LACEN-49	LACEN-50	LACEN-53	LACEN-55	LACEN-56	LACEN-59	
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gás (glucose)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Motilidade	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Halofilia - 0%	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Halofilia - 1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Halofilia - 3%	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Halofilia - 6%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Halofilia - 8%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Halofilia - 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato de Simmons	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Ureia Christensen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-manitol	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-hemólise	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
O/129 150 µg	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

CONTINUAÇÃO

### APÊNDICE 3 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA CONVENCIONAL DAS ESTIRPES DE *Aeromonas*.

Espécies	A. caviae (n=51)																								TOTAL(%)			
	LACEN-61	LACEN-62	LACEN-64	LACEN-66	LACEN-67	LACEN-68	LACEN-69	LACEN-71	LACEN-72	LACEN-73	LACEN-74	MS-76	MS-77	MS-78	MS-80	MS-81	MS-82	MS-83	MS-84	MS-85	MS-86	MS-88	MS-89	MS-90		MS-91	MS-92	
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Gás (glucose)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Indol	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	63%
Motilidade	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	69%
ADH	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90%
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Halofilia - 0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90%
Halofilia - 1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Halofilia - 3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	96%
Halofilia - 6%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Halofilia - 8%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Halofilia - 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Citrato de Simmons	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	67%
Ureia Christensen	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2%
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	98%
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
m-inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2%
Lactose	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53%
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	94%
Manose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	27%
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Salicina	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	82%
D-sorbitol	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6%
Celobiose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	76%
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
β-hemólise	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47%
O/129 150 µg	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100%

NOTA: ADH – arginina dihidrolase; LDC – lisina descarboxilase; ODC – ornitina descarboxilase; Gás – produção de gás a partir da fermentação da glucose; H<sub>2</sub>S – produção de sulfeto de hidrogênio; VP – Voges Proskauer; O/129 150µg – resistência AA composto 2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina, 150 µg; NR – não realizado; TOTAL (%) – total, em porcentagem, de reações positivas.

**CONCLUSÃO**

**APÊNDICE 4 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA DAS ESTIRPES  
DE *Aeromonas* REALIZADA PELO SISTEMA VITEK® 2 Compact**

Espécies	<i>A. veronii</i> (n=1)	<i>A. hydrophila</i> (n=9)									
		LACEN-01	LACEN-19	LACEN-35	LACEN-39	LACEN-44	LACEN-60	LACEN-63	MS-79	MS-87	TOTAL (%)
<b>Provas Bioquímicas</b> (Cartão AST-GN09)	LACEN-70										
Ala-Fe-Pro arilamidase	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	44%
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
L-pirrolidonil-arilamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
D-celobiose	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	11%
Beta-galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Produção de H <sub>2</sub> S	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	78%
Beta-n-acetil-glucosaminidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Glutamil arilamidase Pna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Gama-glutamil-transferase	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	22%
Fermentação/glucose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	89%
Beta-glucosidase	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	22%
D-maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
D-manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Beta-xilosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Beta-alanina arilamidase pna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
L-prolina arilamidase	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	56%
Lipase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Palatinose	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	67%
Tirosina arilamidase	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	67%
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Sacarose/sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
D-tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
D-trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Citrato (sódio)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Malonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
5-quetto-d-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Alcalinização l-lactato	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	78%
Alfa-glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Alcalinização succinato	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	89%
Beta-n-acetil-galactosaminidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Alfa-galactosidase	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Fosfatase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Assimilação glicina arilamidase	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	11%
Ornitina descarboxilase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Lisina descarboxilase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Assimilação l-histidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Cumarato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Beta-glucoronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Resistência o/129 (comp.vibro.)	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	67%
Glu-gli-arg-arilamidase	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	78%
Assimilação l-malato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Ellman	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	78%
Assimilação l-lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%

CONTINUA

**APÊNDICE 4 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA DAS ESTIRPES  
DE *Aeromonas* REALIZADA PELO SISTEMA VITEK® 2 Compact**

Espécies	A. sobria (n=13)													TOTAL(%)
	LACEN-02	LACEN-07	LACEN-20	LACEN-26	LACEN-36	LACEN-37	LACEN-38	LACEN-40	LACEN-51	MS-75	MS-93	LACEN-94	LACEN-95	
Ala-Fe-Pro arilamidase	+	+	+	+	+	+	+	-	NR	-	+	+	+	83%
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
L-pirrolidonil-arilamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
D-celobiose	+	-	-	-	-	-	-	+	NR	+	-	-	-	25%
Beta-galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+	+	100%
Produção de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
Beta-n-acetil-glucosaminidase	+	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+	+	100%
Glutamil arilamidase Pna	+	-	+	+	+	+	+	+	NR	-	+	-	+	75%
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+	+	100%
Gama-glutamyl-transferase	-	-	+	+	-	-	-	+	NR	-	+	-	-	33%
Fermentação/glucose	-	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+	+	92%
Beta-glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
D-maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+	+	100%
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+	+	100%
D-manose	+	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+	+	100%
Beta-xilosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
Beta-alanina arilamidase pna	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
L-prolina arilamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+	+	100%
Lipase	-	-	+	+	+	+	+	-	NR	-	+	-	+	58%
Palatinose	-	-	-	-	-	-	+	+	NR	-	+	-	-	25%
Tirosina arilamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+	+	100%
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
Sacarose/sucrose	-	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+	+	92%
D-tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
D-trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+	+	100%
Citrato (sódio)	+	+	+	+	+	-	+	-	NR	+	+	+	-	75%
Malonato	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
5-quetod-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
Alcalinização l-lactato	+	+	-	(+)	-	-	-	(-)	NR	-	(-)	-	-	25%
Alfa-glucosidase	-	-	-	(+)	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	8%
Alcalinização succinato	+	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+	+	100%
Beta-n-acetil-galactosaminidase	+	+	-	+	-	(-)	-	-	NR	-	-	-	-	25%
Alfa-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
Fosfatase	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
Assimilação glicina arilamidase	-	-	-	+	-	-	-	-	NR	+	+	-	-	25%
Ornitina descarboxilase	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
Lisina descarboxilase	-	+	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	+	17%
Assimilação l-histidina	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
Cumarato	+	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+	+	100%
Beta-glucoronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	0%
Resistência o/129 (comp.vibro.)	-	+	+	+	-	-	+	+	NR	+	-	+	+	67%
Glu-gli-arg-arilamidase	+	(+)	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+	+	100%
Assimilação l-malato	-	+	+	+	-	-	-	-	NR	-	+	-	-	33%
Ellman	+	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+	+	100%
Assimilação l-lactato	-	+	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	8%

CONTINUAÇÃO

**APÊNDICE 4 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA DAS ESTIRPES  
DE *Aeromonas* REALIZADA PELO SISTEMA VITEK® 2 Compact**

Espécies	<i>A. caviae</i> (n=51)														
	LACEN-04	LACEN-06	LACEN-08	LACEN-09	LACEN-10	LACEN-11	LACEN-14	LACEN-18	LACEN-22	LACEN-23	LACEN-25	LACEN-29	LACEN-31	LACEN-32	LACEN-42
<b>Provas Bioquímicas</b> (Cartão AST-GN09)															
Ala-Fe-Pro arilamidase	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-pirrolidonil-arilamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Beta-galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Produção de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beta-n-acetil-glucosaminidase	+	+	+	+	+	+	+	+	(-)	+	+	+	+	+	+
Glutamil arilamidase Pna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gama-glutamyl-transferase	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Fermentação/glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Beta-glucosidase	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beta-xilosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Beta-alanina arilamidase pna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-prolina arilamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Lipase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Palatinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Tirosina arilamidase	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Sacarose/sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato (sódio)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-queto-d-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcalinização l-lactato	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alfa-glucosidase	-	-	(-)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Alcalinização succinato	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Beta-n-acetil-galactosaminidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alfa-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fosfatase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Assimilação glicina arilamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina descarboxilase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina descarboxilase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação l-histidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarato	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Beta-glucoronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resistência o/129 (comp.vibro.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glu-gli-arg-arilamidase	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
Assimilação l-malato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ellman	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Assimilação l-lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CONTINUAÇÃO

**APÊNDICE 4 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA DAS ESTIRPES DE *Aeromonas* REALIZADA PELO SISTEMA VITEK® 2 Compact**

A. caviae (n=51)																								
LACEN-43	LACEN-45	LACEN-46	LACEN-47	LACEN-49	LACEN-50	LACEN-53	LACEN-55	LACEN-56	LACEN-59	LACEN-61	LACEN-62	LACEN-64	LACEN-66	LACEN-67	LACEN-68	LACEN-69	LACEN-71	LACEN-72	LACEN-73	LACEN-74	MS-76	MS-77	MS-78	MS-80
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	(+)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	(-)	-	(+)
-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)

CONTINUAÇÃO

**APÊNDICE 4 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA DAS ESTIRPES  
DE *Aeromonas* REALIZADA PELO SISTEMA VITEK® 2 Compact**

Espécies	A. caviae (n=51)											TOTAL (%)
	MS-81	MS-82	MS-83	MS-84	MS-85	MS-86	MS-88	MS-89	MS-90	MS-91	MS-92	
<b>Provas Bioquímicas</b> (Cartão AST-GN09)												
Ala-Fe-Pro arilamidase	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	78%
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
L-pirrolidonil-arilamidase	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	6%
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
D-celobiose	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	76%
Beta-galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Produção de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Beta-n-acetil-glucosaminidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	98%
Glutamil arilamidase Pna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Gama-glutamil-transferase	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	40%
Fermentação/glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Beta-glucosidase	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	82%
D-maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
D-manose	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	14%
Beta-xilosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Beta-alanina arilamidase pna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
L-prolina arilamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	98%
Lipase	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	94%
Palatinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Tirosina arilamidase	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	90%
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	4%
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6%
Sacarose/sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
D-tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
D-trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Citrato (sódio)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Malonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
5-queto-d-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Alcalinização l-lactato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	90%
Alfa-glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-	+	-	8%
Alcalinização succinato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	96%
Beta-n-acetil-galactosaminidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Alfa-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Fosfatase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2%
Assimilação glicina arilamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2%
Ornitina descarboxilase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Lisina descarboxilase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Assimilação l-histidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Cumarato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	98%
Beta-glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
Resistência o/129 (comp.vibro.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Glu-gli-arg-arilamidase	+	(-)	-	-	+	+	+	+	-	+	+	64%
Assimilação l-malato	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	10%
Ellman	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	98%
Assimilação l-lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%

NOTA: (-) = fraco negativo, reação ligeiramente inferior ao limiar; (+) = fraco positivo, reação ligeiramente superior ao limiar; NR = não realizado; TOTAL (%) = total, em porcentagem, de reações positivas.

CONCLUSÃO

**APÊNDICE 5 – TESTE DE SUCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DAS ESTIRPES DE *Aeromonas* AVALIADO PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO**

Espécies	<i>A. trota</i> (n=3)				<i>A. hydrophila</i> (n=7)								<i>A. veronii</i> biovar sobria (n=13)															
	LACEN-02	LACEN-07	LACEN-94	TOTAL (%)	LACEN-01	LACEN-19	LACEN-44	LACEN-60	LACEN-63	MS-79	MS-87	TOTAL (%)	LACEN-20	LACEN-26	LACEN-35	LACEN-36	LACEN-37	LACEN-38	LACEN-39	LACEN-40	LACEN-51	LACEN-70	MS-75	MS-93	LACEN-95	TOTAL (%)		
Ác. Nalidíxico	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	R	S	14%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	8%	
Amicacina	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Amoxi/Ac. Clav.	I	S	S	0%	I	R	R	R	R	I	I	57%	R	S	S	I	I	S	S	S	S	I	I	I	S	S	13%	
Ampicilina	S	S	S	0%	R	R	R	R	R	R	R	100%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100%
Aztreonam	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Cefalotina	R	R	R	100%	R	R	R	R	I	R	R	86%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100%	
Cefazolina	R	R	R	100%	R	R	R	R	R	R	R	71%	R	S	R	I	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	20%	
Cefepima	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Cefoxitina	S	S	S	0%	S	R	S	S	S	S	S	14%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Ceftazidima	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Ceftriaxona	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Ciprofloxacino	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Cloranfenicol	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Imipenem	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Levofloxacino	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Meropenem	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Nitrofurantoina	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Sulfa/Trimet	S	S	S	0%	I	S	S	S	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Tetraciclina	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	0%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	15%	

CONTINUA

**APÊNDICE 5 – TESTE DE SUCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DAS ESTIRPES DE *Aeromonas* AVALIADO PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO**

Espécies	<i>A. caviae</i> (n=51)																									
	LACEN-04	LACEN-06	LACEN-08	LACEN-09	LACEN-10	LACEN-11	LACEN-14	LACEN-18	LACEN-22	LACEN-23	LACEN-25	LACEN-29	LACEN-31	LACEN-32	LACEN-42	LACEN-43	LACEN-45	LACEN-46	LACEN-47	LACEN-49	LACEN-50	LACEN-53	LACEN-55	LACEN-56	LACEN-59	
Ác. Nalidíxico	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Amoxi/Ac. Clav.	I	S	I	S	S	I	S	S	I	S	I	R	S	I	S	S	S	S	R	I	I	I	S	I	R	
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
Aztreonam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Cefalotina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R
Cefazolina	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	
Cefepima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Cefoxitina	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S	R	S	R	S	R	S	I	R	S	I	S	S	S	S	
Ceftazidima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Ceftriaxona	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Ciprofloxacino	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Cloranfenicol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Levofloxacino	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Meropenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Nitrofurantoína	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Sulfa/Trimet	I	I	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	
Tetraciclina	S	S	S	S	S	S	S	R	I	I	S	S	R	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	

CONTINUAÇÃO

**APÊNDICE 5 – TESTE DE SUCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DAS ESTIRPES DE *Aeromonas* AVALIADO PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO**

Espécies	A. caviae (n=51)																								TOTAL(%)			
	LACEN-61	LACEN-62	LACEN-64	LACEN-66	LACEN-67	LACEN-68	LACEN-69	LACEN-71	LACEN-72	LACEN-73	LACEN-74	MS-76	MS-77	MS-78	MS-80	MS-81	MS-82	MS-83	MS-84	MS-85	MS-86	MS-88	MS-89	MS-90		MS-91	MS-92	
Ác. Nalidíxico	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2%	
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Amoxi/Ac. Clav.	I	I	S	R	S	S	S	I	I	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S	8%	
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100%
Aztreonam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Cefalotina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	88%	
Cefazolina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	73%	
Cefepima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Cefoxitina	I	R	S	S	R	R	R	S	I	R	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	27%	
Ceftazidima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Ceftriaxona	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Ciprofloxacino	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Cloranfenicol	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4%	
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Levofloxacino	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Meropenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Nitrofurantoína	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%	
Sulfa/Trimet	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	29%	
Tetraciclina	S	S	S	S	R	I	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	14%	

NOTA: R – resistente; I – intermediário; S – sensível; TOTAL (%) – total, em porcentagem, de estirpes resistentes.

CONCLUSÃO

**APÊNDICE 6 – TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS AUTOMATIZADO DAS ESTIRPES DE *Aeromonas* REALIZADO PELO SISTEMA VITEK® 2 Compact**

Espécies	<i>A. veronii</i> (n=1)	<i>A. hydrophila</i> (n=9)									<i>A. sobria</i> (n=13)															
		LACEN-01	LACEN-19	LACEN-35	LACEN-39	LACEN-44	LACEN-60	LACEN-63	MS-79	MS-87	TOTAL (%)	LACEN-02	LACEN-07	LACEN-20	LACEN-26	LACEN-36	LACEN-37	LACEN-38	LACEN-40	LACEN-51	MS-75	MS-93	LACEN-94	LACEN-95	TOTAL (%)	
Provas Bioquímicas (Cartão AST-GN09)	LACEN-70																									
Amicacina	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Amp/Sulbactam	-	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	77%
Ampicilina	-	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	77%
Aztreonam	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Cefazolina	-	I	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	15%
Cefepima	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Cefotetan	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Ceftazidima	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Ceftriaxona	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Cefuroxima	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Cefuroxima Ax	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Ciprofloxacina	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Gentamicina	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Imipenem	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Levofloxacina	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Meropenem	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Nitrofurantoína	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Pip/Tazob	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Piperacilina	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Sulfa/Trimet	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%
Tobramicina	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0%

CONTINUA

**APÊNDICE 6 – TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS AUTOMATIZADO DAS ESTIRPES DE *Aeromonas* REALIZADO PELO SISTEMA VITEK® 2 Compact**

Espécies	<i>A. caviae</i> (n=51)																									
	LACEN-04	LACEN-06	LACEN-08	LACEN-09	LACEN-10	LACEN-11	LACEN-14	LACEN-18	LACEN-22	LACEN-23	LACEN-25	LACEN-29	LACEN-31	LACEN-32	LACEN-42	LACEN-43	LACEN-45	LACEN-46	LACEN-47	LACEN-49	LACEN-50	LACEN-53	LACEN-55	LACEN-56	LACEN-59	
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Amp/Sulbactam	R	I	R	I	I	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R
Aztreonam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Cefazolina	I	S	S	R	R	I	R	S	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	S	S	R	
Cefepima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Cefotetan	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Ceftazidima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Ceftriaxona	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Cefuroxima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Cefuroxima Ax	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Levofloxacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Meropenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Nitrofurantoína	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Pip/Tazob	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Piperacilina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Sulfa/Trimet	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	
Tobramicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	

CONTINUAÇÃO

**APÊNDICE 6 – TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS AUTOMATIZADO DAS ESTIRPES DE *Aeromonas* REALIZADO PELO SISTEMA VITEK® 2 Compact**

Espécies	A. caviae (n=51)																										
	LACEN-61	LACEN-62	LACEN-64	LACEN-66	LACEN-67	LACEN-68	LACEN-69	LACEN-71	LACEN-72	LACEN-73	LACEN-74	MS-76	MS-77	MS-78	MS-80	MS-81	MS-82	MS-83	MS-84	MS-85	MS-86	MS-88	MS-89	MS-90	MS-91	MS-92	TOTAL (%)
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	S	S	S	0%
Amp/Sulbactam	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	NR	R	R	R	R	R	R	80%
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	NR	R	R	R	R	R	R	92%
Aztreonam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	R	S	S	2%
Cefazolina	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	NR	R	R	R	R	R	R	72%
Cefepima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	R	S	S	2%
Cefotetan	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	S	S	S	0%
Ceftazidima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	R	S	S	2%
Ceftriaxona	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	S	S	S	0%
Cefuroxima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	I	S	S	0%
Cefuroxima Ax	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	NR	S	S	S	I	S	I	0%
Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	S	S	S	0%
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	S	S	S	0%
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	R	S	S	2%
Levofloxacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	S	S	S	0%
Meropenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	R	S	S	2%
Nitrofurantoína	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	R	S	S	2%
Pip/Tazob	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	R	S	S	2%
Piperacilina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	R	S	S	4%
Sulfa/Trimet	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	NR	S	S	S	R	S	S	26%
Tobramicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	S	S	S	0%

NOTA: R – resistente; I – intermediário; S – sensível; TOTAL (%) – total, em porcentagem, de estirpes resistentes; NR – Não realizado.

CONCLUSÃO

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)