

**CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE
OXITETRACICLINA PARA *Aeromonas*
hydrophila ISOLADA DE PESCADO**

DELTON JOSÉ PEREIRA JÚNIOR

2005

59360
050 636

DELTON JOSÉ PEREIRA JÚNIOR

**CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE
OXITETRACICLINA PARA *Aeromonas hydrophila*
ISOLADA DE PESCADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Ciência dos Alimentos para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador
Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2005**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pereira Júnior, Delton José

Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para *Aeromonas hydrophila*
isoladas de pescado / Delton José Pereira Júnior. – Lavras : UFLA, 2005.
48 p. : il.

Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo
dissertação (Mestrado) - UFLA.
Bibliografia.

1. Peixe. 2. Oxitetraciclina. 3. Septicemia hemorrágica. 4. Microbiologia de
alimento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

DELTON JOSÉ PEREIRA JÚNIOR

**CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE
OXITETRACICLINA PARA *Aeromonas hydrophila* ISOLADA DE
PESCADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação “*Stricto Sensu*” em Ciência dos Alimentos para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 4 de março de 2005

Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite

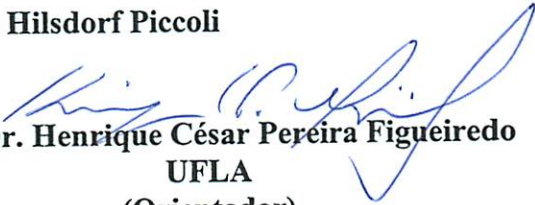
UFMG

Prof^a. Dra. Priscila Vieira Rosa Logato

UFLA

Prof^a. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

UFLA


Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos (DCA) e Doenças de Organismos Aquáticos (DMV), pelo apoio incondicional na execução do experimento.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Ao professor Henrique César Pereira Figueiredo, pela brilhante orientação e contribuição inestimável à minha formação acadêmica.

À Profa. Roberta Hilsdorf Piccoli, pelo auxílio na orientação e apoio durante a realização do experimento.

Aos colegas de laboratório Prof. Geraldo Márcio (DMV), Dircéia, Luciano, entre outros, pelo apoio e excelente convívio.

Aos colegas de pós-graduação Daniela Oliveira, Halan Deny Dal Pupo e Gláucia Frasnelli e graduandos em Med. Veterinária Carlos Leal e Flaviane, Faria pelo auxílio no experimento.

Aos colegas de mestrado em Ciência dos Alimentos Sueli Ciabotti, Melissa Silveira, Cleube Boari, Simone, Daniela Hirsch, Rejeana Lima e Daniela Oliveira, pela amizade e companheirismo.

Aos companheiros de "happy-hour", Rejeana, Barbosa, Gláucia, Guilherme, Daniela, Adriana e Giovanni, entre outros, pelos momentos de descontração.

À minha namorada querida, Fernanda, pelo apoio nos momentos difíceis, companheirismo e dedicação.

Aos meus pais, Delton e Neusa, minhas irmãs Daniela e Dayene e, especialmente, à minha avó Denize, por toda a torcida e incentivo.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Cadeia do pescado no Brasil	3
2.2 <i>Aeromonas hydrophila</i>	5
2.2.1 Ocorrência em água e alimentos	6
2.2.2 Infecções em seres humanos	8
2.2.3 Resistência a antibióticos	9
2.2.3.1 Métodos de determinação de resistência a antibióticos	11
2.3 Tetraciclina: modo de ação e resistência bacteriana	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Delineamento experimental	15
3.2 Pescado	16
3.2.1 Coleta das amostras	16
3.2.2 Processamento para análise microbiológica	17
3.3 Isolamento e identificação fenotípica de <i>Aeromonas hydrophila</i>	17
3.3.1 Identificação presuntiva	17
3.3.2 Identificação final	18
3.4 Determinação da concentração inibitória mínima de oxitetraciclina	19
3.4.1 Seleção das amostras de <i>Aeromonas hydrophila</i>	19
3.4.2 Oxitetraciclina	20
3.4.3 Meio de cultura	21
3.4.4 Preparo dos tubos com concentrações distintas de oxitetraciclina	21
3.4.5 Inóculo	21
3.4.6 Validação dos testes	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 Isolamento e identificação fenotípica.....	23
4.2 Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para <i>Aeromonas hydrophila</i>	25
5 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1	Espécies e quantidade de pescado fresco e congelado coletados para isolamento de <i>Aeromonas hydrophila</i>	16
TABELA 2	Isolados de <i>Aeromonas hydrophila</i> selecionados para determinação da concentração inibitória mínima por fonte, espécie de peixe e origem geográfica	20
TABELA 3	Frequência de isolamento de <i>Aeromonas hydrophila</i> a partir de pescado fresco e congelado	23
TABELA 4	Concentração inibitória mínima (MIC) de oxitetraciclina para os isolados de <i>Aeromonas hydrophila</i> obtidos de pescado fresco, pescado congelado, água e casos clínicos de septicemia em peixes de diferentes origens geográficas	26

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação esquemática da diluição em série de oxitetraciclina e respectivas concentrações, para determinação da concentração inibitória mínima.....	22
FIGURA 2	Distribuição global dos resultados de MIC das amostras testadas.....	31
FIGURA 3	Freqüência de resultados de concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para <i>Aeromonas hydrophila</i> oriunda de pescado, água e caso clínico.....	32

RESUMO

PEREIRA JÚNIOR, Delton José. **Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para *Aeromonas hydrophila* isoladas de pescado.** 2005. 44 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*

Aeromonas hydrophila é uma bactéria ubíqua de ambientes aquáticos, associada a doenças em peixes e seres humanos, que a adquirem por meio de água e alimentos contaminados. Estas bactérias podem servir de fontes de elementos genéticos móveis responsáveis por resistência a antibióticos. No Brasil, o uso de oxitetraciclina em piscicultura é comum, entretanto, não se conhece o nível de resistência a este antibiótico por este patógeno. O objetivo deste trabalho é determinar a concentração inibitória mínima (MIC) de oxitetraciclina para *A. hydrophila* obtida de pescado destinado ao consumo humano e comparar tal perfil com isolados de *A. hydrophila* oriundos de água de cultivo de peixes e de casos de septicemia hemorrágica. Foram coletadas 70 amostras de pescado fresco e congelado de feiras e supermercados do município de Lavras. Foi procedida a rinsagem do pescado, seguida de diluição seriada, semeadura em ágar dextrina-ampicilina (ADA) e incubação a 30°C por 24h. Não foram obtidos isolados oriundos de pescado congelado. A partir do pescado fresco foram obtidos 38 isolados de *A. hydrophila*. Estes foram submetidos à determinação do MIC para oxitetraciclina, juntamente com 62 isolados de *A. hydrophila* oriundos de casos de septicemia hemorrágica e águas de cultivo de peixes, pertencentes ao banco de bactérias do Laboratório de Doenças de Organismos Aquáticos da UFLA. Os resultados de MIC demonstram que 14 dos 100 isolados apresentaram MIC maior que 100µg/mL (resistentes) e o restante inferior a 12,5µg/mL (sensíveis). Não houve diferença na distribuição dos valores de MIC entre os isolados de pescado, caso clínico e água. Dos isolados resistentes, 7 foram de pescado, 6 de caso clínico de septicemia hemorrágica em peixes e apenas um de água de cultivo. Conclui-se que o pescado pode ser carreador de *A. hydrophila* resistente à oxitetraciclina dentro da cadeia alimentar humana.

*Comitê Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo – UFLA (Orientador),
Roberta Hilsdorf Piccoli –UFLA (Co-orientadora)

ABSTRACT

PEREIRA Jr., Delton José. **Minimal Inhibitory Concentration of Oxytetracycline in *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish.** 2005. 44 p. Thesis essay (Master degree in Food Sciences) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais Brazil*

Aeromonas hydrophila is a wide spread bacterium in water environments and it is associated with diseases in fishes and humans who acquire it through water and contaminated food. These bacteria can be a source of mobile genetic elements responsible for resistance to antibiotics. In Brazil, the use of oxytetracycline in pisciculture is common; however, the level of resistance of this pathogen to this particular antibiotic is not known. The aim of the present work is to determine the MIC (Minimal Inhibitory Concentration) of oxytetracycline for the *A. hydrophila* obtained from fishes meant for human consumption, and to compare that profile with isolates of *A. hydrophila* originated from pond water and from outbreaks of hemorrhagic septicemia. Seventy samples of fresh and frozen fish from open markets and supermarkets from the Lavras city were collected. A rinse of the fish was carried out, and this was followed by serial dilution, spread-plating in dextrin-Ampicillin agar (ADA), and incubation at 30°C for 24 hours. No isolates were obtained from the frozen fish. From the fresh fish, there were 38 *A. hydrophila* isolates. These were submitted to the determination for the oxytetracycline MIC together with 62 isolates of *A. hydrophila* originated from of hemorrhagic septicemia cases and pond water belonging to the bacterial culture collection of the UFLA Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (Laboratory of Diseases of Aquatic Animals of the Federal University of Lavras). The MIC results indicated that 14 of the 100 isolates have shown MIC higher than 100µg/ml (resistant) and the remaining lower than 12,5 µg/ml (sensitive). There was no difference in the distribution of MIC values amongst the isolates from fishes, clinical cases and water. From the resistant isolates, 7 came from fishes, 6 from the clinical cases of hemorrhagic septicemia in fishes and only 1 from the pond water. It is concluded that the marketed fish can be a vehicle of *A. hydrophila* resistant to oxytetracycline in the human food chain.

*Tutorial Committee: Henrique César Pereira Figueiredo–UFLA (major advisor)
Roberta Hilsdorf Piccoli–UFLA (Co-advisor)

1 INTRODUÇÃO

As atividades produtivas e comerciais ligadas à aqüicultura e pesca têm crescido no Brasil em decorrência do aumento das demandas por peixes e derivados pelos mercados interno e externo. A comercialização de pescado é caracterizada pela venda de peixes frescos eviscerados ou congelados eviscerados. Entretanto, ainda não existe no Brasil quantidade suficiente de unidades de abate adequadamente tecnificadas para processamento do pescado. Esse procedimento eleva o risco de contaminação do alimento por bactérias patogênicas aos seres humanos e ou bactérias comensais carreadoras de elementos genéticos responsáveis por resistência a antibióticos.

A piscicultura brasileira passa por um processo de intensificação dos sistemas de produção, o que acarreta em aumento da freqüência de surtos de doenças infecciosas e uso indiscriminado de antibióticos. Dentre essas doenças, a septicemia causada por *Aeromonas* spp. tem sido diagnosticada com freqüência.

Além da infecção em peixes, as bactérias do gênero *Aeromonas* causam gastroenterite em seres humanos, especialmente em crianças, idosos e pacientes imunossuprimidos. São considerados patógenos veiculados pela água e por alimentos contaminados, de interesse emergente em saúde pública (WHO, 2004).

Uma das preocupações recentes em saúde pública é o aumento acentuado de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos. Diversos experimentos são conduzidos com o intuito de monitorar a transferência de genes de resistência entre bactérias, patogênicas ou não, associadas à cadeia

alimentar humana. A oxitetraciclina é o antibiótico mais utilizado em pisciculturas, o que implica em maior pressão de seleção de bactérias resistentes.

O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração inibitória mínima (MIC) de oxitetraciclina para *Aeromonas hydrophila* obtida de pescado destinado ao consumo humano e comparar tal perfil com isolados de *A. hydrophila* obtidos de água de cultivo de peixes e de casos clínicos de septicemia hemorrágica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cadeia do pescado no Brasil

A produção de pescado é responsável por mais que 15% do montante de proteína de origem animal produzida no mundo, o que representa papel importante na segurança alimentar humana. A pesca e a aquicultura mundial são responsáveis pela alocação de 35 milhões de pessoas no mercado de trabalho e movimentam anualmente cerca de 55 bilhões de dólares em exportações e importações (FAO, 2002).

O consumo *per capita* de pescado na América do Sul é de 8,5kg/ano, inferior à média mundial (16kg/ano) e à da China (25kg/ano). O consumo *per capita* de pescado no Brasil é baixo, cerca de 6kg ao ano, quando comparado ao de outras fontes de proteína de origem animal como aves (25kg/ano), bovinos (29kg/ano) e suínos (10kg/ano). Outro fato relevante é que apenas 10% da população brasileira consome pescado regularmente (Rasguido & Albanez, 2000). Estes dados indicam que a atividade no Brasil tem potencial de expansão, atrelada a campanhas de estímulo ao consumo, diminuição do custo do produto ao consumidor e melhoria da renda média da população do país (FAO, 2002).

As principais espécies de peixes produzidas no Brasil são: pacu (*Piaractus mesopotamicus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), piaçu (*Leporinus fredericii*), matrinxã (*Brycon amazonicum*), carpa (*Cyprinus carpio*), pintado (*Pseudoplatystoma corruicans*) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com características satisfatórias para pesca esportiva e cultivo comercial (Castagnolli, 2004).

Há tendência mundial de ascensão da produção de peixes cultivados e declínio da pesca extrativista (FAO, 2002). No entanto, a aquicultura representa cerca de 19% da produção nacional de pescado, ou seja, a pesca extrativista continua amplamente difundida no Brasil, juntamente com o mercado informal de pescado (Shirota & Sonoda, 2004). Em levantamento elaborado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2004), foi verificado que a produção brasileira de pescado, no ano de 1999, foi de cerca de 748 mil toneladas, sendo 605 mil toneladas oriundas da pesca (marítima e continental) e 143 mil toneladas provenientes da aquicultura.

Aspecto importante referente à cadeia do pescado no Brasil é a venda ao consumidor por meio de feiras livres, pesque-pagues e supermercados. As formas de apresentação do pescado ao consumidor são peixes inteiros, eviscerados ou não ou cortes especiais, como postas e filés (Macedo-Viegas & Souza, 2004; Roubach et al., 2003). O pescado comercializado *in natura* é denominado pescado fresco (mantido em gelo), pescado resfriado ($-0,5^{\circ}\text{C}$ a 2°C) ou pescado congelado (mantido a -20°C). Geralmente, o pescado é processado de forma artesanal por pessoas envolvidas na produção, sem qualificação profissional suficiente para o processamento higiênico, ao contrário do que ocorre em indústrias de pescado. Outro fator relevante é que o setor de processamento e industrialização do pescado no Brasil apresenta pouca expressividade, ou seja, há carência de unidades de abate e processamento (Ostrensky et al., 2000). Este fato está diretamente relacionado ao baixo nível de inspeção sanitária dos produtos oriundos de aquicultura e pesca. Isto implica no aumento da veiculação de bactérias patogênicas e comensais carreadoras de resistência a antibióticos por este alimento.

2.2 *Aeromonas hydrophila*

As bactérias do gênero *Aeromonas* são cocobastonetes gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbicos facultativos que ocorrem de forma ubiqüitária e autóctone em ambientes aquáticos (Kirov et al., 2002; Merino et al., 1995; WHO, 2004). Colwell et al. (1986) propuseram a criação da família *Aeromonadaceae* para alocar o gênero *Aeromonas*, todavia, a classificação vigente considera o gênero pertencente à família *Vibrionaceae* (Janda & Abbott, 1998; Merino et al., 1995; Pemberton et al., 1997; Popoff & Verón, 1984).

O gênero *Aeromonas* apresenta algumas características fenotípicas semelhantes às da família *Enterobacteriaceae*, sendo diferenciada primariamente por apresentar resultado positivo no teste da enzima oxidase (WHO, 2004). As principais espécies mesofílicas do gênero são: *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biotipo sobria. Estas estão associadas a doenças em seres humanos sendo consideradas patógenos gastrintestinais secundários (Janda & Abbott, 1998; Kirov et al., 2002; WHO, 2004). Dentre as espécies de *Aeromonas* móveis, a *A. hydrophila* é considerada a mais patogênica aos seres humanos e peixes de água doce (Merino et al., 1995; Janda & Abbott, 1998; Rhodes et al., 2000). Os principais fatores de virulência relatados em *A. hydrophila* são: adesinas, elastase, enterotoxinas termoestáveis e termolábeis e hemolisinas (Cascón et al., 2000; Handfield et al., 1996; Sha et al., 2002).

As principais fontes de contaminação de seres humanos por *Aeromonas hydrophila* são os alimentos contaminados e água. Crianças, idosos e pacientes imunossuprimidos são os grupos mais acometidos, podendo apresentar diarreias secretórias (diarreia aquosa aguda e vômito), diarreia aguda com sangue e muco, diarreia crônica e sintomas sistêmicos, como inflamação do tecido conjuntivo e septicemia (WHO, 2004). *A. hydrophila* pode causar, em menor frequência, síndrome hemolítica urêmica, meningite, peritonite e lesões cutâneas (Janda & Abbott, 1998).

Em peixes de água doce, as infecções causadas por *Aeromonas hydrophila* são comuns e os sinais clínicos podem variar de lesões de pele superficiais ou profundas, com presença de áreas de hemorragia e necrose muscular, a quadros típicos de septicemia cujos sinais podem incluir exoftalmia, abdômen distendido com presença de líquido serosangüinolento e petéquias em vísceras. Situações de estresse, como nível baixo de oxigênio dissolvido, elevação da matéria orgânica na água e elevada densidade animal predis põem os peixes à infecção por *A. hydrophila* (Noga, 1996).

A *A. hydrophila*, além de ser um patógeno para peixes e seres humanos, também pode ser fonte de elementos genéticos móveis codificadores de resistência a antibióticos, como plasmídeos R, integrons e transposons (Sorum & L'Abée-Lund, 2002). A ocorrência deste patógeno é amplamente relatada em alimentos e água destinados ao consumo humano.

2.2.1 Ocorrência em água e alimentos

A ocorrência de *Aeromonas* móveis é amplamente relatada em água e diversos alimentos como vegetais, leite e derivados, carnes e pescado.

O isolamento de *A. hydrophila* em água é bastante comum, com relatos de água de poços artesianos (Ghenghesh et al., 2001; Kühn et al. 1997a; Massa et al., 2001), mineral (Crocì et al., 2001), de sistema de distribuição (Kühn et al.; 1997b), tratada com cloro (Handfield et al., 1996a), de abatedouro bovino (Bizani & Brandelli, 2001), de rio (Gibotti et al., 2000; Goñi-Urriza et al., 2000) e de cultivo de peixes (Hänninen et al., 1997; Hirsch, 2004; Schmidt et al., 2001).

Em vegetais destinados ao consumo humano, *Aeromonas hydrophila* já foi isolada sob diferentes formas de apresentação desse tipo de alimento, como vegetais “in natura” (Berrang et al., 1989; Martins et al., 2002; Saad, et al.,

1995; Soriano et al., 2000), vegetais orgânicos (McMahon & Wilson, 2001) e vegetais minimamente processados (McMahon & Wilson, 2001; Szabo et al., 2000; Villari et al., 2000). O isolamento de *Aeromonas hydrophila* foi descrito em leite cru, pasteurizado e derivados (Araujo et al., 2002; Freitas et al., 1993; Gran et al., 2003; Martins et al., 2002; Melas et al., 1999; Villari et al., 2000; Yadav & Kumar, 2000). A ocorrência em leite pasteurizado, geralmente, deve-se à contaminação após a pasteurização (Gran et al., 2003), podendo, o resfriamento durante o armazenamento favorecer o crescimento de *A. hydrophila* no leite (Lafarge et al., 2004). Há relatos também da ocorrência de *Aeromonas hydrophila* em carne crua (Handfield et al., 1996a; Martins et al., 2002), salame e presunto cru (Villari et al., 2000).

Em peixes e outros organismos aquáticos, o isolamento de *A. hydrophila* é comum tanto com apresentação clínica da doença quanto em animais sadios. Tsai & Chen (1996) relataram o isolamento de *Aeromonas hydrophila* em ostras, camarão e peixes marinhos destinados ao consumo humano em Taiwan. Pettibone et al. (1996) descreveram o isolamento de 14 amostras de *A. hydrophila* a partir de pele, intestino, rim e fígado de *Ictalurus nebulosus*. Hänninen et al. (1997) observaram a ocorrência de *A. hydrophila* como a espécie de maior frequência entre os isolados de *Aeromonas* móveis de peixes de supermercados (76%), peixes com suspeita de doença (46%), ovas de peixes (80%) e camarão (100%), em estudo realizado em Helsinque, Finlândia. González et al. (2001) determinaram a ocorrência de *Aeromonas* spp. em peixes frescos de água doce, oriundos de pisciculturas e de rio. Neste experimento, os espécimes foram coletados e resfriados em sacos plásticos para avaliar o efeito da estocagem à baixa temperatura na população de *Aeromonas* móveis. Houve aumento sequencial na população de *Aeromonas hydrophila* após 3, 6, 9, 12 e 15 dias de resfriamento. Vivekanandhan et al. (2002) relataram o isolamento de 268 e 51 amostras de *A. hydrophila* em peixes e lagostas, respectivamente, oriundas

de supermercados de Coimbatore (Índia). González-Rodríguez et al. (2002) isolaram *A. hydrophila* de filés de truta refrigerado, em supermercados na Espanha. Radu et al. (2003) avaliaram a presença de *Aeromonas* spp. em peixes comercializados em supermercados na Malasia e isolaram 60 amostras, tendo 11,5% sido identificadas como *A. hydrophila*. Thayumanavan et al. (2003) relataram o isolamento de 255 amostras de *A. hydrophila* em cerca de 36% das lagostas e 37% dos peixes oriundos de pesca no sul da Índia. Castro-Escarpulli et al. (2003) relataram o isolamento de *A. hydrophila* em tilápias do Nilo congeladas, comercializadas em supermercados da Cidade do México o que pode representar um risco para o consumidor pela sobrevivência da bactéria ao congelamento.

2.2.2 Infecções em seres humanos

As bactérias do gênero *Aeromonas* podem causar gastroenterites, síndrome hemolítica urêmica, septicemia ou bacteremia, meningite, peritonite, lesões cutâneas, doenças do trato respiratório e infecções oculares em seres humanos (Janda & Abbott, 1998).

Chang & Bolton (1987) relataram a obtenção de 31 isolados de *Aeromonas* spp. obtidas de um hospital na Austrália, sendo 29 oriundas de fezes (26 de pacientes com diarreia), uma de ferida cutânea e uma de caso de septicemia. Os mesmos autores relataram o isolamento de 40 amostras de *Aeromonas* de casos de diarreia na Indonésia e 4 na Índia. Ko et al. (1996) determinaram o perfil de resistência a antibióticos de 142 isolados de *A. hydrophila* oriundos de sangue, feridas cutâneas, ascite, fezes e bile de casos clínicos em hospitais de Taiwan. Kühn et al. (1997a), Nojimoto et al. (1997) e Yakav & Kumar (2000) relataram o envolvimento de *Aeromonas* spp. em fezes diarreicas de crianças em Bangladesh, no Brasil e na Índia, respectivamente.

Martins et al. (2002) isolaram 95 amostras de *Aeromonas* spp. a partir de amostras de fezes diarreicas. *A. hydrophila* foi a espécie mais comum (36%), das quais, 21% eram enterotoxigênicas, 100% hemolíticas e 72% citotoxigênicas. Vila et al. (2003) encontraram *Aeromonas* spp. em apenas 2% dos pacientes com diarreia dos viajantes, tendo *A. hydrophila* sido isolada apenas em um dos casos, na Índia. Estes fatos comprovam que *Aeromonas hydrophila* é um patógeno emergente com relevância em saúde humana.

O envolvimento de *A. hydrophila* em doenças extraintestinais de seres humanos é raro. Entretanto, Mukhopadhyay et al. (2003) relataram a ocorrência de um caso de pneumonia por aspiração e mielite cervical, causada por *Aeromonas hydrophila*, em uma menina de 13 anos na Índia.

Infecções em seres humanos causadas por *Aeromonas* spp. não são raras, entretanto, na maioria dos casos, o diagnóstico não é realizado, o que acarreta em subestimação dos dados (Janda & Abbott, 1998). O aumento da frequência de diagnóstico, aliado ao aumento da resistência a antibióticos por este gênero de bactérias, indica a importância de *Aeromonas* spp. para a saúde pública.

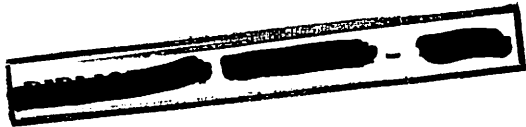
2.2.3 Resistência a antibióticos

A resistência a antibióticos por *Aeromonas hydrophila* e outras espécies do gênero *Aeromonas* é diversificada e varia de acordo com a região de estudo, porém, de forma geral, elas são resistentes à ampicilina (resistência cromossômica) e apresentam sensibilidade à tetraciclina variável.

A resistência a antibióticos pelo gênero *Aeromonas* já foi citada em estudos realizados em diversos países. Há relatos de resistência a antibióticos e quimioterápicos de diversos grupos: ácido nalidíxico, amoxicilina, bacitracina, carbenicilina, cefadroxil, cefaloridina, cefalotina, cefazolina, cefoperazona, ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, fosfomicina,

gentamicina, kanamicina, lincomicina, meticilina, neomicina, norfloxacina, novobiocina, oxacilina, penicilina, polimixina B, rifampicina, streptomina, sulfonamida, tetraciclina, ticarcilina, tobramicina, trimetoprim, trimoxazole e vancomicina (Bizani & Brandelli, 2001; Chang & Bolton, 1987; DePaola et al., 1995; Ghenghesh et al., 2001; Goñi-Urriza et al., 2000; Hatha et al., 2005; Hirsch, 2004; Ko et al., 1996; Motyl et al., 1985; Petersen & Dalsgaard, 2003; Pettibone et al., 1996; Radu et al., 2003; Saha & Pal, 2002; Son et al., 1997; Vivekanandhan et al., 2002). A resistência pode se referir a apenas um ou a vários antibióticos e quimioterápicos simultaneamente, fenômeno conhecido como múltipla resistência a antibióticos (Diaz, 2003).

A resistência aos antibióticos do grupo da tetraciclina é variável entre regiões distintas. Chang & Bolton (1987) relataram 20% de resistência à tetraciclina entre as amostras de *A. hydrophila* isoladas na Austrália, Índia e Indonésia. DePaola et al. (1995), em levantamento nos Estados Unidos, relataram a frequência de resistência à tetraciclina das amostras de *A. hydrophila* isoladas de conteúdo intestinal de channel catfish (*Ictalurus punctatus*) e água dos tanques de cultivo, 21,7% e 45,7%, respectivamente. Entretanto, este trabalho indicou que, após o período de tratamento antibiótico houve declínio da resistência à tetraciclina. Ko et al. (1996) encontraram 51% de susceptibilidade entre amostras de *Aeromonas* provenientes de casos clínicos em seres humanos em Taiwan. Son et al. (1997) obtiveram 10 amostras de *A. hydrophila* resistentes à tetraciclina das 21 amostras testadas em estudo realizado na Malásia. Schmidt et al. (2001) encontraram 69% de resistência à oxitetraciclina entre as amostras de *Aeromonas* isoladas de águas de cultivo de peixes na Dinamarca. Vivekanandhan et al. (2002) relataram a ocorrência de resistência à tetraciclina em 53% e 41% das amostras de *A. hydrophila* isoladas de peixes e lagosta, respectivamente, na Índia. Petersen & Dalsgaard (2003) relataram a frequência de 37% de isolados de *Aeromonas* spp. resistentes à oxitetraciclina na Tailândia.



Radu et al. (2003) e Hatha et al. (2005) obtiveram 40% de amostras de *A. hydrophila* resistentes à tetraciclina, na Malásia e na Índia, respectivamente.

Entretanto, outros trabalhos demonstram baixo nível de resistência de *A. hydrophila* à tetraciclina. Nos Estados Unidos, Motyl et al. (1985) não encontraram amostras de *A. hydrophila* resistentes à tetraciclina. Ghenghesh et al. (2001) obtiveram apenas 5% de amostras de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* resistentes à tetraciclina, em estudo realizado na Itália. No Brasil (Bizani & Brandelli, 2001) e na Índia (Saha & Pal, 2002), 100% e 75% das amostras de *A. hydrophila* isoladas, respectivamente, foram sensíveis a tetraciclina.

2.2.3.1 Métodos de determinação de resistência a antibióticos

A resistência de microrganismos a antibióticos pode ser determinada de forma qualitativa ou quantitativa. A determinação qualitativa é realizada por meio do método de difusão de discos de antibióticos (Bauer-Kyrby) e fornece como resultados apenas se o microrganismo é sensível ou resistente a um determinado antibiótico. Este método é relativamente rápido e empregado rotineiramente para orientação de terapias antimicrobianas. A determinação qualitativa fornece o nível de resistência ao antibiótico, ou seja, a concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo “in vitro”, isto é, a concentração inibitória mínima do antibiótico (MIC). Essa determinação é baseada nos testes de diluição em meio sólido, micro e macro diluição em caldo. Os valores de MIC podem ser utilizados para a definição de doses terapêuticas de novas drogas e para estudo de dinâmica de resistência a antimicrobianos em uma dada população de bactérias.

Em contexto clínico a resistência bacteriana aos antimicrobianos é definida como a capacidade da bactéria de crescer, *in vitro*, na presença da concentração sérica que uma determinada droga atinge, conforme

recomendações terapêuticas. Já em termos epidemiológicos, a definição de susceptibilidade e resistência de um microrganismo a um determinado antibiótico varia de acordo com o comportamento populacional da espécie bacteriana testada em diferentes locais. Portanto, os valores de MIC usuais para um antibiótico podem variar quando são analisadas espécies bacterianas distintas (Bruun et al., 2000).

2.3 Tetraciclina: modo de ação e resistência bacteriana

O grupo de antibióticos conhecido como tetraciclina possui como estrutura básica quatro anéis cíclicos fundidos. Os principais representantes do grupo são a oxitetraciclina e clortetraciclina (naturais de primeira geração), doxiciclina, minociclina e metaciclina (semisintéticos, segunda geração) e glicilciclina (semisintéticos, terceira geração). São antibióticos bacteriostáticos de amplo espectro, possuindo atividade contra bactérias gram-negativas e positivas, clamídias, micoplasmas, rickettsias e protozoários. Esta característica evidencia o amplo uso deste antibiótico em seres humanos e animais (Chopra & Roberts, 2001; Speer et al., 1992).

As tetraciclina são amplamente utilizadas por médicos em terapias e profilaxia, por médicos veterinários no tratamento de infecções em animais de produção e de companhia e como promotores de crescimento, ou seja, administrados na ração para aumentar o ganho de peso dos animais. Devido à ocorrência de doenças infecciosas, à facilidade de manipulação da droga, ao baixo custo e à eficácia do tratamento, a oxitetraciclina tem sido amplamente utilizada em ambientes aquáticos (Chopra & Roberts, 2001; Speer et al., 1992).

O mecanismo de ação destes antibióticos consiste basicamente em impedir a ligação do tRNA (RNA transportador) ao ribossomo bacteriano, interferindo com a síntese de proteínas pela bactéria. As moléculas de

tetraciclina atravessam a membrana externa de bactérias gram-negativas por meio de canais de porinas OmpF e OmpC, que são canais de valência coordenada carregados positivamente com cátions, provavelmente magnésio. A molécula de tetraciclina é liberada no periplasma e, por ser lipofílica, difunde-se para o citoplasma bacteriano. Após a entrada na célula bacteriana, liga-se à subunidade 30S do ribossomo de forma reversível, o que provavelmente explica sua atividade bacteriostática (Chopra & Roberts, 2001; Speer et al., 1992).

O uso massivo de tetraciclina acarreta em crescimento da resistência a este antibiótico. Os mecanismos de resistência são: efluxo das moléculas de tetraciclina, proteção ribossomal e inativação da droga, codificados pelos genes *tet* ou *otc* encontrados em bactérias gram-positivas e gram-negativas. O efluxo de tetraciclina é o principal mecanismo de resistência e o que possui a maior diversidade de genes codificadores. Consiste no bombeamento das moléculas de tetraciclina para o exterior da célula bacteriana, por meio de proteínas associadas à membrana (proteínas *tet*), com gasto de energia, impedindo que o antibiótico se ligue ao ribossomo. A proteção ribossômica consiste na ligação da proteína codificada pelo gene de resistência ao ribossomo, alterando a estrutura do mesmo impedindo a ligação da tetraciclina na subunidade 30S. Esse mecanismo não afeta a síntese protéica. A inativação da droga é um mecanismo ainda pouco esclarecido, pois a enzima responsável pela inativação requer oxigênio e NADPH para atuar e foi encontrada apenas em bactérias anaeróbias (Chopra & Roberts, 2001; Speer et al., 1992).

Existem diversos mecanismos de transferência de resistência entre bactérias ambientais e clínicas. Diversas classes de determinantes de resistência à tetraciclina são transferidos por plasmídeos R, transposons, transposons conjugativos e integrons de classe 1. Estes elementos genéticos podem ser transferidos, de forma horizontal, entre bactérias com origem filogenética

distante (Rhodes et al., 2000; Schmidt et al., 2001; Sorum & L'Abée-Lund, 2002).

Rhodes et al. (2000) demonstraram que *Aeromonas* spp. oriundas de efluentes não tratados de um hospital e de tanques de cultivo de peixes na Inglaterra foram capazes de transferir plasmídeos de resistência à oxitetraciclina. Adams et al. (1998) demonstraram que 66% dos isolados de *A. salmonicida* foram capazes de transferir um plasmídeo R de resistência à oxitetraciclina para *Escherichia coli*. Goñi-Urriza et al. (2000) constataram que os níveis de resistência à tetraciclina e quinolonas aumentaram após o deságue do esgoto no rio, indicando transferência de genes entre *Aeromonas* e *Enterobacteriaceae*. Schmidt et al. (2001) encontraram uma frequência de 44% de amostras de *Aeromonas* spp. com integrons de classe 1, responsáveis por resistência à tetraciclina, indicando que *Aeromonas* móveis podem adquirir genes de resistência interagindo com bactérias oriundas do solo ou de efluentes domésticos.

Com o crescimento da resistência à tetraciclina, torna-se importante o monitoramento de populações bacterianas oriundas de diversas fontes relacionadas, direta ou indiretamente, à cadeia alimentar humana (Sorum & L'Abée-Lund, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

O experimento foi dividido nas seguintes etapas: coleta de espécimes, isolamento e identificação fenotípica, e determinação da concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para as amostras obtidas.

A primeira etapa consistiu de coletas em dias distintos de peixe fresco eviscerado e de peixes congelados. Os isolados bacterianos obtidos desses peixes foram submetidos a testes de triagem e, posteriormente, a testes bioquímicos para identificação fenotípica da espécie *A. hydrophila*.

Na segunda etapa, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas dos isolados de *A. hydrophila* obtidos na etapa anterior do experimento e, para comparação, as de isolados de *A. hydrophila* selecionados do banco de bactérias do Laboratório de Doenças de Organismos Aquáticos da Universidade Federal de Lavras (amostras dos anos 2002 a 2004).

3.2 Pescado

3.2.1 Coleta das amostras

As coletas de pescado fresco e eviscerado foram realizadas em feiras livres do município de Lavras e as de pescado congelado em supermercados e mercearias do mesmo município, em dias distintos. Para todas as coletas, peixes destinados ao consumo humano (Tabela 1) foram adquiridos e transportados ao laboratório em sacos plásticos estéreis e caixas isotérmicas com gelo reciclável.

TABELA 1 Espécies e quantidade de pescado fresco e congelado coletados para o isolamento de *Aeromonas hydrophila*

COLETA	TIPO DE PESCADO	ESPECIES	QUANTIDADE
1ª	Fresco	Mandi-amarelo (<i>Pimelodus maculatus</i>), piau (<i>Leporinus fredericii</i>) e curimba (<i>Prochilodus scrofa</i>);	10
2ª	Congelado	Traíra (<i>Hoplias malabaricus</i>);	10
3ª	Fresco	Mandi-amarelo (<i>P. maculatus</i>), piau (<i>L. fredericii</i>) e curimba (<i>P. scrofa</i>);	10
4ª	Congelado	Traíra (<i>H. malabaricus</i>);	10
5ª	Congelado	Traíra (<i>H. malabaricus</i>) e curimba (<i>P. scrofa</i>);	10
6ª	Congelado	Curimba (<i>P. scrofa</i>) e truta (<i>Onchorinchus mykiss</i>);	5
7ª	Fresco	Mandi-amarelo (<i>P. maculatus</i>), piau (<i>L. fredericii</i>) e curimba (<i>P. scrofa</i>);	10
8ª	Fresco	Mandi-amarelo (<i>P. maculatus</i>), tilápia do nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) e curimba (<i>P. scrofa</i>).	5
TOTAL			70

3.2.2 Processamento para análise microbiológica

No laboratório, o pescado congelado foi descongelado à temperatura ambiente. Após, os peixes inteiros (frescos ou descongelados) foram lavados com 200mL de água peptonada 0,1% estéril, no próprio saco de transporte, para remoção do muco superficial. Esse lavado foi acondicionado em becker estéril e, posteriormente, retirada uma alíquota para diluição seriada de base dez em tubos com água peptonada 0,1% estéril. De cada diluição obtida foram retiradas alíquotas de 100 μ L para análise microbiológica.

3.3 Isolamento e identificação fenotípica de *Aeromonas hydrophila*

Para o isolamento, utilizou-se o meio seletivo ágar dextrina-ampicilina (ADA) (Handfield et al., 1996b; Havelaar et al., 1987). Alíquotas de 100 μ L, oriundas da diluição seriada, foram inoculadas, em duplicata, pelo método de plaqueamento em superfície (“spread-plate”). Após a incubação a 30°C por 24 horas, colônias que fermentaram dextrina em placa (colônias amareladas, com halo amarelo ao redor) foram selecionadas, identificadas e repicadas em ágar soja tripticaseína (TSA, Biolife, Itália). As mesmas foram incubadas a 30°C por 24 horas.

3.3.1 Identificação presuntiva

Das amostras que fermentaram dextrina no ADA (Biolife, Itália), selecionaram-se, no mínimo, cinco colônias, posteriormente submetidas aos seguintes testes: coloração de Gram, catalase e oxidase. Apenas os cocobastonetes gram-negativos, catalase e oxidase positivos foram utilizados nos testes bioquímicos para identificação fenotípica da espécie.

3.3.2 Identificação final

As amostras sugestivas de *Aeromonas* spp. foram submetidas aos seguintes testes para identificação fenotípica da espécie: fermentação de carboidratos (arabinose, manitol, myo-inositol, sacarose, salicina, glicose, trealose e dextrina), utilização de aminoácidos (lisina, ornitina e arginina), hidrólise de esculina e produção de acetoina (Voges-Proskauer). A amostra *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 foi utilizada para a validação de todos os testes bioquímicos (Bergey's Manual, 1984; Janda & Abbott, 1998).

Os testes de fermentação de carboidratos foram realizados utilizando o caldo base Phenol Red (Biolife, Itália), suplementado com os respectivos carboidratos na concentração de 1%, exceto a salicina (0,5%), e incubados à temperatura de 30°C por 24 a 48 horas.

Para os testes de utilização de aminoácidos, empregou-se o caldo Møeller Descarboxilase (Biolife, Itália), suplementado com os respectivos aminoácidos na concentração de 1% e incubado à temperatura de 30°C por 24 a 48 horas (Mac Faddin, 1980).

A hidrólise de esculina foi avaliada utilizando-se o caldo base acrescido de esculina (Merck, USA), incubado à temperatura de 30°C durante 3 dias (Quinn et al., 1994). Para verificação da produção de acetoina foi utilizado o caldo Voges-Proskauer, incubado à temperatura de 30°C por 5 dias e, para revelação, KOH 40% e α -naftol (MacFaddin, 1980).

Os isolados bacterianos que foram positivos para todos os testes bioquímicos, exceto fermentação de myo-inositol e utilização de ornitina, foram classificados como *Aeromonas hydrophila* (Bergey's Manual, 1984; Janda & Abbott, 1998).

Todos os isolados obtidos foram armazenados a -70°C em caldo contendo glicerol, para posterior determinação do MIC.

3.4 Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima de oxitetraciclina foi determinada pelo método de macrodiluição em caldo, conforme recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS, 1997).

3.4.1 Seleção das amostras de *Aeromonas hydrophila*

Para a determinação do MIC de oxitetraciclina, foram utilizados todos os isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos dos peixes avaliados neste estudo. Adicionalmente, 62 isolados de *A. hydrophila*, obtidos de água de cultivo de peixes e de casos clínicos de septicemia hemorrágica, foram selecionados para a determinação do MIC de oxitetraciclina e comparação dos resultados com os valores de MIC dos isolados oriundos de pescado (Tabela 2). Tais isolados pertencem ao banco de bactérias do Laboratório de Doenças de Organismos Aquáticos da Universidade Federal de Lavras, relativos aos anos de 2002 a 2004.

TABELA 2 Isolados de *Aeromonas hydrophila* selecionados para determinação da concentração inibitória mínima por fonte, espécie de peixe e origem geográfica.

FONTE	ESPÉCIE	ORIGEM GEOGRÁFICA	NÚMERO DE AMOSTRAS
Pescado fresco ¹	²	Lavras, MG	38
Caso clínico ³	Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Esmeraldas, MG	12
Caso clínico	Piracanjuba (<i>Brycon orbignianus</i>)	Itutinga, MG	3
Água ⁴		Itutinga, MG	4
Água		Itutinga, MG	4
Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Itutinga, MG	7
Água		Lavras, MG	4
Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Lavras, MG	1
Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Paraíba do Sul, RJ	8
Caso clínico	Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	Passo Fundo, RS	10
Água		Perdões, MG	5
Água		Três Pontas, MG	3
Água		Três Pontas, MG	1
TOTAL			100

1- Bactérias obtidas de pescado fresco eviscerado destinado ao consumo humano;

2- Espécies: Curimba (*Prochilodus scrofa*) (18), mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) (14), piau (*Leporinus fredericii*) (2) e tilápia (*O. niloticus*) (4);

3- Bactérias isoladas de vísceras com septicemia hemorrágica;

4- Bactérias isoladas de fontes ambientais como água de tanques de cultivo e água de abastecimento.

3.4.2 Oxitetraciclina

De acordo com protocolo descrito por Miranda & Zemelman (2002), preparou-se uma solução de dihidrato de oxitetraciclina (Sigma, USA) na concentração de 8mg/mL. Essa solução foi obtida utilizando-se HCl 1M (Merck, França) e água destilada até a completa dissolução. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1N (Sigma, USA) e a solução foi esterilizada por meio de filtragem em membranas 0,22µm (Milipore, USA).

3.4.3 Meio de cultura

Foi utilizado o caldo Müeller Hinton (Biolife, Itália) suplementado com cátions divalentes cálcio e magnésio. Cada litro de caldo Müeller Hinton foi suplementado com 5 mL de solução estoque estéril de cloreto de magnésio (83,6mg/mL) e 5 mL da solução estoque estéril de cloreto de cálcio (73,6mg/mL), conforme descrito por Alderman & Smith (2001).

3.4.4 Preparo dos tubos com concentrações distintas de oxitetraciclina

Uma série de tubos de rosca foi utilizada para cada amostra. O primeiro continha 4,5mL de caldo Mueller-Hinton e os demais 2,5mL. Adicionou-se 0,5mL da solução de oxitetraciclina (8mg/mL), obtendo-se a concentração de 800µg/mL no primeiro tubo. A partir deste tubo, diluições seriadas de base 2 foram realizadas nos demais tubos, obtendo-se concentrações decrescentes, variando de 800 a 0,39µg/mL de oxitetraciclina (Figura 1). Para cada amostra preparou-se um tubo controle de crescimento bacteriano, sem a presença de oxitetraciclina e, para todas as amostras, um tubo sem antibiótico e sem *Aeromonas hydrophila* para controle da esterilidade do meio de cultura.

3.4.5 Inóculo

As amostras selecionadas de *A. hydrophila* foram descongeladas a temperatura ambiente, repicadas em TSA (Biolife, Itália) e incubadas a 30°C por 24 horas. Suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina 0,85% estéril, ajustando-se a turbidez para a escala 0,5 de MacFarland (bioMérieux, França), o que corresponde a, aproximadamente, 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (mL). Essa suspensão foi diluída 10 vezes, obtendo-se densidade aproximada de 10^7 UFC/mL. Alíquotas de 5µL desta suspensão foram inoculadas nos tubos de rosca (12x100mm) contendo o caldo Mueller-

Hinton (Biolife, Itália) suplementado com cátions (Alderman & Smith, 2001) e a respectiva concentração de oxitetraciclina (Figura 1).

3.4.6 Validação dos testes

Para todos os dias de testes, determinaram-se as concentrações inibitórias mínimas das amostras de referência *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, com o objetivo de evitar variações entre diferentes dias de teste.

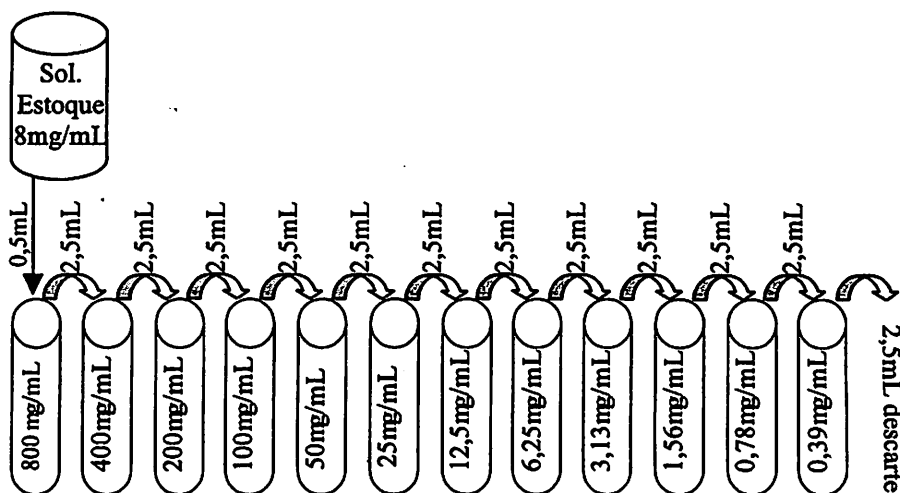


FIGURA 1 Representação esquemática da diluição em série de oxitetraciclina e respectivas concentrações, para determinação da concentração inibitória mínima.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e identificação fenotípica

Dos espécimes de pescado fresco foram selecionadas 250 colônias que fermentaram dextrina em ADA. Destes isolados, 236 foram classificados presuntivamente e, após a identificação fenotípica, 38 foram identificadas como *Aeromonas hydrophila*, conforme demonstra a Tabela 3.

TABELA 3 Frequência de isolamento de *Aeromonas hydrophila* a partir de pescado fresco e congelado.

COLETA	TIPO DE PESCADO	NÚMERO DE ISOLADOS DE <i>Aeromonas hydrophila</i>
1 ^a	Fresco	10
2 ^a	Congelado	0
3 ^a	Fresco	15
4 ^a	Congelado	0
5 ^a	Congelado	0
6 ^a	Congelado	0
7 ^a	Fresco	5
8 ^a	Fresco	8
TOTAL		38

O isolamento de *A. hydrophila* de pescado fresco ou resfriado é amplamente relatado na literatura (Fernandes et al., 1998; González et al., 2001; González-Rodríguez et al., 2002; Hänninen et al., 1997; Tsai & Chen, 1996. Tsai & Chen (1996) avaliaram o efeito da temperatura na ocorrência de *A. hydrophila* em ostras, camarões e peixes marinhos. As amostras isoladas tiveram seu crescimento retardado, porém, resistiram ao resfriamento a 5°C. González et al.

(2001), trabalhando com peixes frescos e, posteriormente, resfriados, observaram que as bactérias do gênero *Aeromonas* resistiram e apresentaram crescimento sob resfriamento a 0°C. González-Rodríguez et al. (2002) relataram o crescimento de amostras de *A. hydrophila* em filés de truta e postas de salmão submetidos ao resfriamento a 3°C, por 10 e 7 dias, respectivamente. Estes estudos indicaram que *A. hydrophila* apresenta crescimento no alimento estocado a baixas temperaturas, o que representa um risco para a cadeia alimentar humana. *A. hydrophila* foi isolada em todas as coletas de peixes frescos realizadas, o que sugere contaminação freqüente desse produto.

Com relação ao pescado congelado, não houve presença de colônia fermentadora de dextrina em ADA. Entretanto, houve o crescimento de colônias de bactérias não fermentadoras de tal carboidrato. Na tentativa de isolamento de possíveis amostras de *A. hydrophila* não fermentadoras de dextrina 100 colônias obtidas dos peixes congelados foram selecionadas e submetidas aos testes presuntivo e final. Todos os isolados selecionados não foram identificados fenotipicamente como *A. hydrophila* (Tabela 3). As possíveis causas da falha de isolamento de *A. hydrophila* a partir de peixes congelados não foram determinadas. Na literatura, não há trabalhos que avaliem criteriosamente a capacidade das bactérias do gênero *Aeromonas* em resistir ao processo de congelamento. Boari (2004), avaliando a contaminação de filés de tilápia-donilo (*Oreochromis niloticus*) por *Aeromonas* spp. antes e após 30 dias de congelamento (-20°C), observou que tal procedimento eliminou este microrganismo até então presente no alimento. Castro-Escarpulli et al. (2003) relataram o isolamento de 82 amostras de *Aeromonas* spp. de 250 tilápias-donilo (*Oreochromis niloticus*) congeladas comercializadas em supermercados na Cidade do México. *A. hydrophila* representou apenas 2,6% dos isolados de *Aeromonas* spp, ou seja, o isolamento deste microrganismo em pescado congelado parece ser pouco freqüente.

4.2 Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para *A. hydrophila*

Foram determinados valores de MIC dos 38 isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de pescado fresco. Devido à ubiquidade dessa bactéria em ambientes aquáticos e de cultivo de peixes foi determinado também, para fins de comparação, o MIC de 62 outros isolados de *Aeromonas hydrophila*, oriundos de 12 diferentes pisciculturas, localizadas em 7 municípios distintos, dos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande de Sul. Os resultados individuais das concentrações inibitórias mínimas de oxitetraciclina para os 100 isolados avaliados encontram-se na Tabela 4.

TABELA 4 Concentração inibitória mínima (MIC) de oxitetraciclina para os isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de pescado fresco, água e casos clínicos de septicemia em peixes, de diferentes origens geográficas.

AMOSTRA	FONTE	ESPÉCIE (NOME CIENTÍFICO)	ORIGEM GEOGRÁFICA	PROPRIEDADE ¹	MIC (µg/mL)
1	Pescado fresco ²	Mandi (<i>Pimelodus maculatus</i>)	Lavras, MG	-	400
2	Pescado fresco	Curimba (<i>Prochilodus scrofa</i>)	Lavras, MG		200
3	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		200
4	Pescado fresco	Mandi (<i>P. maculatus</i>)	Lavras, MG		100
5	Pescado fresco	Mandi (<i>P. maculatus</i>)	Lavras, MG		100
6	Pescado fresco	Mandi (<i>P. maculatus</i>)	Lavras, MG		100
7	Pescado fresco	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Lavras, MG		100
8	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		6,25
9	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		6,25
10	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		3,13
11	Pescado fresco	Mandi (<i>P. maculatus</i>)	Lavras, MG		3,13
12	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		3,13
13	Pescado fresco	Mandi (<i>P. maculatus</i>)	Lavras, MG		3,13
14	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		3,13
15	Pescado fresco	Mandi (<i>P. maculatus</i>)	Lavras, MG		1,56
16	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		1,56
17	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		1,56
18	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		1,56
19	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		1,56
20	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		1,56
21	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		1,56
22	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		1,56
23	Pescado fresco	Mandi (<i>P. maculatus</i>)	Lavras, MG		1,56

... continua ...

“TABELA 4 Cont.”

24	Pescado fresco	Mandi (<i>P. maculatus</i>)	Lavras, MG	-	1,56
25	Pescado fresco	Mandi (<i>P. maculatus</i>)	Lavras, MG		1,56
26	Pescado fresco	Mandi (<i>P. maculatus</i>)	Lavras, MG		1,56
27	Pescado fresco	Mandi (<i>P. maculatus</i>)	Lavras, MG		1,56
28	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		1,56
29	Pescado fresco	Piau (<i>Leporinus fredericii</i>)	Lavras, MG		1,56
30	Pescado fresco	Piau (<i>L. fredericii</i>)	Lavras, MG		1,56
31	Pescado fresco	Mandi (<i>P. maculatus</i>)	Lavras, MG		1,56
32	Pescado fresco	Mandi (<i>P. maculatus</i>)	Lavras, MG		1,56
33	Pescado fresco	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Lavras, MG		1,56
34	Pescado fresco	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Lavras, MG		1,56
35	Pescado fresco	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Lavras, MG		1,56
36	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		1,56
37	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		1,56
38	Pescado fresco	Curimba (<i>P. scrofa</i>)	Lavras, MG		0,78
39	Água ³	-	Itutinga, MG	A	3,13
40	Água	-	Itutinga, MG		3,13
41	Água	-	Itutinga, MG		1,56
42	Água	-	Itutinga, MG		1,56
43	Água	-	Itutinga, MG	B	1,56
44	Água	-	Itutinga, MG		1,56
45	Água	-	Itutinga, MG		1,56
46	Água	-	Itutinga, MG		1,56
47	Água	-	Lavras, MG	C	1,56
48	Água	-	Lavras, MG		1,56
49	Água	-	Lavras, MG		1,56
50	Água	-	Lavras, MG		1,56

... continua...

"TABELA 4 Cont."

51	Água	-	Perdões, MG	D	6,25
52	Água	-	Perdões, MG		1,56
53	Água	-	Perdões, MG		1,56
54	Água	-	Perdões, MG		1,56
55	Água	-	Perdões, MG		1,56
56	Água	-	Três Pontas, MG	E	100
57	Água	-	Três Pontas, MG	F	1,56
58	Água	-	Três Pontas, MG		1,56
59	Água	-	Três Pontas, MG		0,78
60	Caso clínico ⁴	Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Esmeraldas, MG	G	6,25
61	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Esmeraldas, MG		3,13
62	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Esmeraldas, MG		3,13
63	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Esmeraldas, MG		1,56
64	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Esmeraldas, MG		1,56
65	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Esmeraldas, MG		1,56
66	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Esmeraldas, MG		1,56
67	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Esmeraldas, MG		1,56
68	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Esmeraldas, MG		1,56
69	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Esmeraldas, MG		0,78
70	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Esmeraldas, MG		0,78
71	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Esmeraldas, MG		0,78
72	Caso clínico	Piracanjuba (<i>Brycon orbignianus</i>)	Itutinga, MG	H	1,56
73	Caso clínico	Piracanjuba (<i>B. orbignianus</i>)	Itutinga, MG		1,56
74	Caso clínico	Piracanjuba (<i>B. orbignianus</i>)	Itutinga, MG		0,78
75	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Itutinga, MG	I	12,5
76	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Itutinga, MG		6,25
77	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Itutinga, MG		3,13

... continua...

"TABELA 4 Cont."

78	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Itutinga, MG	I	3,13
79	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Ituting, MG		1,56
80	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Itutinga, MG		1,56
81	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Itutinga, MG		1,56
82	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Lavras, MG	J	1,56
83	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Paraíba do Sul, RJ	K	800
84	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Paraíba do Sul, RJ		400
85	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Paraíba do Sul, RJ		200
86	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Paraíba do Sul, RJ		200
87	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Paraíba do Sul, RJ		200
88	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Paraíba do Sul, RJ		200
89	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Paraíba do Sul, RJ		6,25
90	Caso clínico	Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	Paraíba do Sul, RJ		1,56
91	Caso clínico	Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	Passo Fundo, RS	L	3,13
92	Caso clínico	Jundiá (<i>R. quelen</i>)	Passo Fundo, RS		1,56
93	Caso clínico	Jundiá (<i>R. quelen</i>)	Passo Fundo, RS		1,56
94	Caso clínico	Jundiá (<i>R. quelen</i>)	Passo Fundo, RS		1,56
95	Caso clínico	Jundiá (<i>R. quelen</i>)	Passo Fundo, RS		1,56
96	Caso clínico	Jundiá (<i>R. quelen</i>)	Passo Fundo, RS		1,56
97	Caso clínico	Jundiá (<i>R. quelen</i>)	Passo Fundo, RS		1,56
98	Caso clínico	Jundiá (<i>R. quelen</i>)	Passo Fundo, RS		1,56
99	Caso clínico	Jundiá (<i>R. quelen</i>)	Passo Fundo, RS		1,56
100	Caso clínico	Jundiá (<i>R. quelen</i>)	Passo Fundo, RS		1,56

- 1- Diferentes unidades de piscicultura indicadas pelas letras A a J;
- 2- Bactérias obtidas de lavados de pescado fresco eviscerado destinado ao consumo humano;
- 3- Bactérias isoladas de água de abastecimento de pisciculturas;
- 4- Bactérias isoladas de vísceras de peixes com septicemia hemorrágica.

A definição de resistência e susceptibilidade pode ser interpretada de diferentes maneiras, principalmente quando são considerados dados quantitativos de MIC. Bruun et al. (2000) definem resistência e susceptibilidade a um antibiótico, para dada espécie bacteriana, quando um conjunto de isolados de tal microrganismo submetidos ao teste de MIC, divide-se em dois grupos com valores de inibição distintos. Essa separação permite a classificação dos isolados em resistentes e sensíveis. Os isolados “sensíveis”, apresentam níveis baixos de resistência ao antibiótico, enquanto os isolados “resistentes”, apresentam níveis mais elevados de resistência. Este critério de classificação foi adotado neste estudo. A Figura 2 mostra a distribuição dos isolados de *Aeromonas hydrophila*, de acordo com os diferentes valores de MIC de oxitetraciclina obtidos. Como pode ser observado, houve agrupamento das bactérias testadas em duas categorias: $MIC \leq 12,5\mu\text{g/mL}$ e $MIC \geq 100\mu\text{g/mL}$. Das amostras testadas, 86% agruparam-se na categoria de valores inferiores de MIC (sensíveis), enquanto as demais (14%) agruparam-se nos valores superiores (resistentes). Não houve isolado com MIC de oxitetraciclina igual a 25 e $50\mu\text{g/mL}$, o que evidencia a separação das duas categorias.

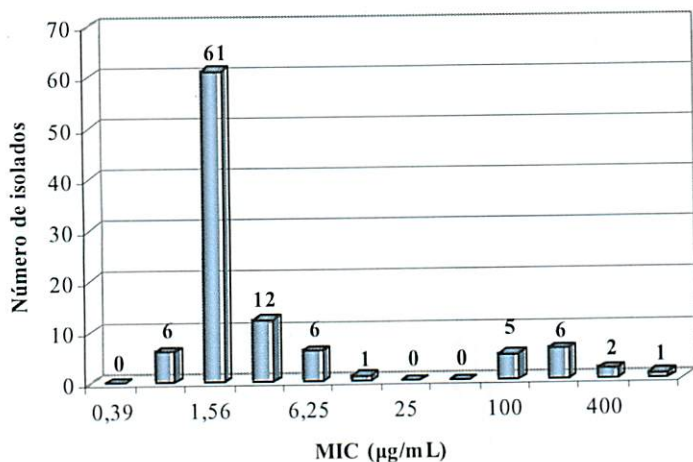


FIGURA 2 Distribuição de isolados de concentração inibitória mínima de *Aeromonas hydrophila*, de acordo com os valores de concentração inibitória mínima de oxitetraciclina.

Na literatura, não há relatos de trabalhos avaliando MIC de oxitetraciclina para um número elevado de isolados de *A. hydrophila*, ou seja, não há valores de referência para população de um microrganismo. O NCCLS (1997), comitê responsável pela padronização das metodologias de determinação de resistência a antibióticos, fornece os parâmetros de avaliação de resistência pelos diversos métodos: disco de difusão (método qualitativo) ou determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição ou macrodiluição em caldo e diluição em meio sólido (quantitativo). No entanto, este comitê fornece valores de referência de MIC apenas para bactérias de interesse clínico humano. Dentre estas bactérias, a família *Enterobacteriaceae*, que possui ampla distribuição ambiental e é gram-negativa, pode servir de base de comparação. Os valores de MIC de tetraciclina para classificação como sensível ou resistente para bactérias desta família são, respectivamente, $\leq 4\mu\text{g/mL}$ e $>16\mu\text{g/mL}$, próximo ao encontrado neste estudo para *Aeromonas hydrophila*.

A Figura 3 traz os valores de MIC separados pelas fontes analisadas no experimento (pescado, água de cultivo e caso clínico de septicemia hemorrágica em peixes). Não foram observadas tendências distintas entre as fontes avaliadas individualmente.

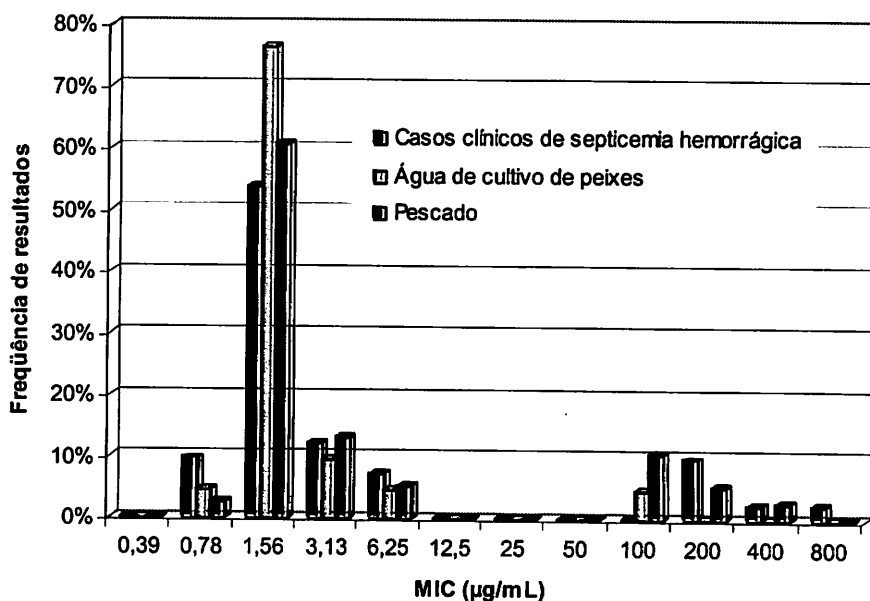


FIGURA 3 Frequência de resultados de concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para *Aeromonas hydrophila* oriunda de pescado, água de cultivo e caso clínico de septicemia hemorrágica em peixes.

Dos 38 isolados de *A. hydrophila* oriundos de pescado, 18% foram resistentes à oxitetraciclina. De forma geral, as propriedades se assemelharam ao perfil de resistência à oxitetraciclina, entretanto, a propriedade “K”, localizada em Paraíba do Sul, RJ, apresentou o maior índice de resistência (75% dos isolados). Nesta propriedade há o histórico de utilização de oxitetraciclina no tratamento de doenças infecciosas, fato que pode estar associado ao elevado nível de resistência. Isso reforça a hipótese de que a resistência a antibióticos é

variada entre ambientes e regiões, dependendo, principalmente, da pressão de seleção imposta a esses ecossistemas.

Além de poucos relatos disponíveis na literatura, não há uma padronização suficiente da metodologia de MIC que permite a comparação para bactérias de origem aquática e ou associadas a hospedeiros heterotérmicos. Diversas fontes de variação podem interferir nos valores de MIC para determinado antibiótico, tais como a forma de diluição da droga, o tipo de meio de cultura utilizado, a padronização do inóculo bacteriano e a temperatura de incubação (Alderman & Smith, 2001; Bruun et al., 2001). A temperatura, por exemplo, pode exercer efeitos na estabilidade dos agentes antimicrobianos, fisiologia e metabolismo bacteriano e nas bases genéticas de regulação e expressão gênica, afetando os resultados de concentração inibitória mínima (Michel & Blanc, 2001). Adicionalmente, isolados de uma mesma espécie bacteriana, adaptados diferencialmente a climas tropicais ou temperados, podem apresentar características distintas de crescimento *in vitro*. Para bactérias de ambientes aquáticos existem recomendações para determinação do MIC em temperaturas de cultivo de 22°C a 30°C, sem haver até o momento uma avaliação crítica dessa variação na temperatura de incubação. Portanto, há necessidade de desenvolver métodos de referência para a determinação da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos por bactérias associadas a doenças de peixes (Alderman & Smith, 2001; Smith, 2001).

Os valores de MIC de antibióticos utilizados em aquicultura são raros na literatura. Os poucos dados disponíveis mostram valores de MIC inferiores a 2µg/mL (Motyl et al., 1985) e valores elevados de 64 a 2048µg/mL (Miranda & Zemelman, 2002). No entanto, não há relatos de experimentos avaliando um grande número de isolados de *A. hydrophila* oriundos de fontes variadas. Os dados obtidos permitem inferir que as fontes avaliadas não foram causa de variação nos valores de MIC, no entanto, o uso indiscriminado de oxitetraciclina

nas pisciculturas brasileiras pode promover o aumento nos níveis de resistência de bactérias ambientais. No Brasil, não há regulamentação do uso destas drogas em ambientes aquáticos, o que pode agravar tal situação.

5 CONCLUSÃO

O pescado congelado analisado não apresentou contaminação por *Aeromonas hydrophila*. Entretanto, houve isolamento de *A. hydrophila* a partir do pescado fresco, tendo estes isolados apresentado valores de concentração inibitória mínima de oxitetraciclina entre 0,78 e 400µg/mL. Não houve diferença nos resultados de concentração inibitória mínima de oxitetraciclina entre os isolados de *A. hydrophila* obtidos de pescado fresco e os isolados das demais fontes (água de cultivo e caso clínico de septicemia hemorrágica). Isto indica que o pescado fresco analisado representa um potencial carreador de bactérias resistentes à oxitetraciclina para a cadeia alimentar humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, C. A.; AUSTIN, B.; MEADEN, P. G.; McINTOSH, D. Molecular characterization of plasmid-mediated oxytetracycline resistance in *Aeromonas salmonicida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 11, p. 4194-4201, Nov. 1998.

ALDERMAN, D. J.; SMITH, P. Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 196, n. 3/4, p. 211-243, May 2001.

ARAÚJO, V. S.; PAGLIARES, V. A.; QUEIROZ, M. L.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 6, p. 1172-1177, June 2002.

BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE MICROBIOLOGY. 9. ed. Baltimore: Willians & Willians, 1994. 787 p.

BERRANG, M. E.; BRACKETT, R. E.; BEUCHAT, L. R. Growth of *Aeromonas hydrophila* on fresh vegetables stored under a controlled atmosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 9, p. 2167-2171, set. 1989.

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 334-339, Oct./Dec. 2001.

BOARI, C. A. **Isolamento, caracterização de microrganismos deteriorantes e patogênicos associados à produção de filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2004. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BRUUN, M. S.; SCHMIDT, A. S.; MADSEN, L.; DALSGAARD, I. Antimicrobial resistance patterns in danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 187, n. 3/4, p. 201-212, July 2000.

CASCÓN, A.; YUGUEROS, J.; TEMPRANO, A.; SÁNCHEZ, M.; HERNANZ, C.; LUENGO, J. M.; NAHARRO, G. A Major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 6, p. 3233-3241, June 2000.

CASTAGNOLLI, N. Estado da arte da aqüicultura no Brasil. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 1-6.

CASTRO-ESCARPULLI, G.; FIGUERAS, M. J.; AGUILERA-ARREOLA, G.; SOLER, L.; FERNÁNDEZ-RENDÓN, E.; APARICIO, G. O.; GUARRO, J.; CHACÓN, M. R. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 41-49, July 2003.

CHANG, B. J.; BOLTON, S. M. Plasmids and resistance to antimicrobial agents in *Aeromonas sobria* and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 31, n. 8, p. 1281-1282, Aug. 1987.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 65, n. 2, p. 232-260, June 2001.

COLWELL, R. R.; MACDONELL, M. R.; DE LEY, J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Amsterdam, v. 36, n. 3, p. 473-477, July 1986.

CROCI, L.; DI PASQUALE, S.; COZZI, L.; TOTI, L. Behavior of *Aeromonas hydrophila* in bottled mineral waters. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n.11, p. 1836-1840, Nov. 2001.

DePAOLA, A.; PEELER, J. T.; RODRICK, G. E. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in Catfish Ponds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 6, p. 2335-2340, June 1995.

DÍAZ, P. S. Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. **Revista Española de Quimioterapia**, Barcelona, v. 16, n. 2, p. 172-187, jun. 2003.

FERNANDES, C. F.; FLICK, G. J.; THOMAS, T. B. Growth of inoculated psychrotrophic pathogens on refrigerated fillets of aquacultured rainbow trout and channel catfish. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n.3, p. 313-317, Mar. 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Estados Unidos, 2002.

FREITAS, A. C.; NUNES, M. P.; MILHOMEM, A. M.; RICCIARDI, I. D. Occurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n.1, p. 62-65, Jan. 1993.

GHENGHESH, K. S.; EL-GHODBAN, A.; DKAKNI, R.; ABEID, S.; ALTOMI, A.; TARHUNI, A.; MARIALIGETI, K. Prevalence, species differentiation, Haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. in untreated well water. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 2, p. 169-173, Feb. 2001.

GIBOTTI, A.; SARIDAKIS, H. O.; PELAYO, J. S.; TAGLIARI, K. C.; FALCÃO, D. P. 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**, Oxford, v. 89, n. 1, p. 70-75, July 2000.

GOÑI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C.; RAYMOND, N.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. Impact of a urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 1, p. 125-132, Jan. 2000.

GONZÁLEZ, C. J.; SANTOS, J. A.; GARCÍA-LOPEZ, M. L.; GONZÁLEZ, N.; OTERO, A. Mesophilic aeromonads in wild and aquacultured freshwater fish. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 5, p. 687-691, May 2001.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. N.; SANZ, J. J.; SANTOS, J. A. OTERO, A. GARCÍA-LOPEZ, M. L. Foodborne pathogenic bacteria in prepackaged fresh retail portions of farmed rainbow trout and salmon stored at 3°C. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 76, n. 1/2, p. 135-141, 2002.

GRAN, H. M.; WETLESEN, A.; MUTUKUMIRA, A. N.; RUKURE, G.; NARVHUS, J. A. Occurrence of pathogenic bacteria in raw milk, cultured pasteurised milk and naturally soured milk produced at small-scale dairies in Zimbabwe. **Food Control**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 539-544, Dec. 2003.

HANDFIELD, M.; SIMARD, P.; COUILLARD, M.; LETARTE, R. *Aeromonas hydrophila* isolated from food and drinking water: Hemagglutination, Hemolysis, and Cytotoxicity for a human Intestinal cell line (HT-29). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3459-3461, Sept 1996a.

HANDFIELD, M.; SIMARD, P.; LETARTE, R. Differential media for quantitative recovery of waterborne *Aeromonas hydrophila*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3544-3547, Sept. 1996b.

HÄNNINEN, M. L.; OIVANEN, P.; HIRVELÄ-KOSKI, V. *Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 17-26, Jan. 1997.

HAVELAAR, A. H.; DURING, M.; VERSTEEGH, J. F. M. Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 279-287, Mar. 1987.

HATHA, M. A. A.; VIVEKANANDHAN, G.; CHRISTOL, J. J. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farmed raised fresh water fish. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, p. 131-134, 2005.

HIRSCH, D. **Identificação e resistência antimicrobiana de *Aeromonas* móveis provenientes de peixes e ambientes aquáticos**. 2004. 42p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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**, Chicago, v. 27, n. 2, p. 332-344, Mar. 1998.

KIROV, S. M.; TASSELL, B. C.; SEMMLER, A. B. T.; O'DONOVAN, L. A.; RABAAN, A. A.; SHAW, J. G. Lateral Flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 2, p. 547-555, Jan. 2002.

KO, W. C.; YU, K. W.; LIU, C. Y.; HUANG, C. T.; LEU, H. S; CHUANG, Y. C. Increasing antibiotic resistance in clinical isolates of *Aeromonas* strains in Taiwan. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, Washington, v. 40, n. 5, p. 1260-1262, May 1996.

KÜHN, I.; ALBERT, M. J.; ANSARUZZAMAN, M.; BHUTYAN, N. A.; ALABI, S. A.; ISLAM, M. S.; NEOGI, P. K. B.; HUYS, G.; JANSSEN, P.; KERSTERS, K.; MÖLLBY, R. Characterization of *Aeromonas* spp. Isolated from Humans with Diarrhea, from Healthy Controls, and from Surface Water in Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 2, p. 369-373, Feb. 1997a.

KÜHN, I.; ALLESTAM, G.; HUYS, G.; JANSSEN, P.; KERSTERS, K.; KROVACEK, L.; STENSTROM, T. A. Diversity, persistence, and virulence of *Aeromonas* strains isolated from drinking water distribution systems in Sweden. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 7, p. 2708-2715, July 1997b.

LAFARGE, V.; OGIER, J.; GIRARD, V.; MALADEN, V.; LEVEAU, J. Y.; GRUSS, A.; DELACROIX-BUCHET, A. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 9, p. 5644-5650, Sept. 2004.

MACEDO-VIÉGAS, E. M.; SOUZA, M. L. R. Pré-processamento e conservação do pescado produzido em piscicultura. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 405-480.

MARTINS, L. M.; MARQUEZ, R. F.; YAHO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 237-242, Jan. 2002.

- MASSA, S.; ALTIERI, C.; D'ANGELA, A. The occurrence of *Aeromonas* spp. in natural mineral water and well water. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 63, n. 1/2, p. 169-173, Jan. 2001.
- MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacterias**. 2. ed. Baltimore, 1980. 527 p.
- McMAHON, M. A. S.; WILSON, I. G. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 70, n. 1/2, p. 155-162, Oct. 2001.
- MELAS, D. S.; PAPAGEORGIOU, D. K.; MANTIS, A. I. Enumeration and confirmation of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, and *Aeromonas sobria* isolated from raw milk and other milk products in Northern Greece. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 5, p. 463-466, May 1999.
- MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; TOMÁS, J. M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 157-168, Dec. 1995.
- MICHEL, C.; BLANC, G. Minimal inhibitory concentration methodology in aquaculture: the temperature effect. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 196, n. 3/4, p. 311-318, May 2001.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 30 dez. 2004.
- MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 212, n. 1/4, p. 31-47, Sept. 2002.
- MOTYL, M. R.; McKINLEY, G.; JANDA, J. M. In Vitro Susceptibilities of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* to 22 Antimicrobial Agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 28, n. 1, p. 151-153, July 1985.
- MUKHOPADHYAY, C.; BHARGAVA, A.; AYYAGARI, A. *Aeromonas hydrophila* and aspiration pneumonia: a diverse presentation. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, v. 44, n. 6, p. 1087-1090, Dec. 2003.

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4. ed. Villanova: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997. Approved Standard. NCCLS document M7-A4,

NOGA, E. J. **Fish disease: diagnosis and treatment.** St. Louis: Mosby-Year Book, 1996. 367 p.

NOJIMOTO, I. T. I.; BEZANA, C. S. C.; CARMO, C.; VALADÃO, L. M.; CARRIJO, K. M. 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**, Uberaba, v. 30, n. 5, p. 385-388, set./out. 1997.

OSTRENSKY, A.; BORGUETTI, J. R.; PEDINI, M.; Situação atual da aquicultura brasileira e mundial. In: VALENTI, W. C.; POLI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGUETTI, J. R. (Ed.) **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável.** Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. p. 353-382.

PEMBERTON, J. M.; STEPHEN, P. K.; SCHMIDT, R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 1-10, July 1997.

PETERSEN, A.; DALSGAARD, A. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 219, n. 2, p. 71-82, Apr. 2003

PETTIBONE, G. W.; MEAR, J. P.; SAMPSELL, B. M. Incidence of antibiotic and metal resistance and plasmid carriage in *Aeromonas* isolated from brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 234-240, Oct. 1996.

POPOFF, M. A.; VÉRON, M. Taxonomy study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 94, p. 11-22, May 1976.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology.** London: Mosby, 1994. 648 p.

RADU, S.; AHMAD, N.; LING, F. H.; REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 261-266, Mar. 2003.

RASGUIDO, J. E. A.; ALBANEZ, J. R. Piscicultura em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 32-37, 2000.

RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J.; MCGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; PICKUP, R. W. Distribution of Oxytetracycline resistance Plasmids between *Aeromonads* in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the Tetracycline Resistance determinant Tet A. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 3883-3890, Sept. 2000.

ROUBACH, R.; CORREIA, E. S.; ZAIDEN, S.; MARTINO, R. C.; CAVALLI, R. O. Aqüicultura brasileira. **Panorama da aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, p. 47-57, mar./abr. 2003.

SAAD, S. M. Y.; IARIA, S. T.; FURLANETTO, S. M. P. Motile *Aeromonas* spp. in retail vegetables from São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 22-27, jan. 1995.

SAHA, D.; PAL, J. *In vitro* antibiotic susceptibility of bacteria isolated from EUS-affected fishes in India. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 311-316, 2002.

SCHMIDT, A. S.; BRUUN, M. S.; DALSGAARD, I.; LARSEN, J. L. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 12, p. 5675-5682, Dec. 2001.

SHA, J.; KOZLOVA, E. V.; CHOPRA, 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**, Washington, v. 70, n. 4, p. 1924-1935, Apr. 2002.

SHIROTA, R.; SONODA, D. Y. Comercialização de pescados no Brasil: caracterização dos mercados. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 501-516.

SMITH, P. Accuracy, precision and meaning of antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 196, n. 2/4, p. 253-266, May 2001.

SON, R.; RUSUL, G.; SAHILAH, A. M.; ZAINURI, A.; RAHA, A. R.; SALMAH, I. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, *Telapia* (*Telapia mossambica*). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 479-482, June 1997.

SORIANO, J. M.; RICO, H.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 58, n. 1/2, p. 123-128, June 2000.

SORUM, H.; L'ABEÉ-LUND, T. M. Antibiotic resistance in food-related bacteria – a result of interfering with the global web of bacterial genetics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 1/2, p. 43-56, Sept. 2002.

SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Bacterial resistance to Tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 5, n. 4, p. 387-399, Oct. 1992.

SZABO, E. A.; SCURRAH, K. J.; BURROWS, J. M. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, n. 6, p. 456-460, June 2000.

THAYUMANAVAN, T.; VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; SUBASHKUMAR, R.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Incidence of haemolysin-positive and drug-resistant *Aeromonas hydrophila* in freshly caught finfish and prawn collected from major commercial fishes of coastal South India. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 36, n. 1/2, p. 41-45, May 2003.

TSAI, G. J.; CHEN, T. H. Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 31, n. 1/3, p. 121-131, Aug. 1996.

VILA, J.; RUIZ, J.; GALLARDO, F.; VARGAS, M.; SOLER, L.; FIGUERAS, M. J.; GASCON, J. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 5, p: 552-555, May 2003.

VILLARI, P.; CRISPINO, M.; MONTUORI, P.; STANZIONE, S. Prevalence and molecular characterization of *Aeromonas* spp. in ready-to-eat foods in Italy. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 12, p. 1754-1757, Dec. 2000.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A. A. M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 76, n. 1/2, p. 165-168, June 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Microbial Fact Sheets. In: - _____ . **Guidelines for drinking-water quality**. 3. ed. Geneva, 2004. (v. 1. Recommendations)

YADAV, A. S.; KUMAR, A. Prevalence of enterotoxigenic motile aeromonads in children, fish, milk and ice-cream and their public health significance. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health**, Bangkok, v. 31, n. 1, p. 153-156, 2000.