



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JULIANA CARUSI

**OCORRÊNCIA, PERFIL DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS DE *Aeromonas* sp. EM ÁGUA DE IRRIGAÇÃO E
VEGETAIS**

**CAMPINAS
2017**

JULIANA CARUSI

**OCORRÊNCIA, PERFIL DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS DE *Aeromonas* sp. EM ÁGUA DE IRRIGAÇÃO E
VEGETAIS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: PROF. DRA. DIRCE YORIKI KABUKI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA JULIANA CARUSI E ORIENTADA PELA PROFa. DRa. DIRCE YORIKI KABUKI

**CAMPINAS
2017**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

C251i Carusi, Juliana, 1987-
Ocorrência, perfil de virulência e resistência aos antimicrobianos de *Aeromonas* sp. em água de irrigação e vegetais / Juliana Carusi. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Dirce Yorika Kabuki.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Aeromonas* sp.. 2. Água de irrigação. 3. Vegetais. 4. Virulência. 5. Resistência a antimicrobianos. I. Kabuki, Dirce Yorika. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Occurrence, virulence profile and antimicrobial resistance of *Aeromonas* sp. from irrigation water and vegetables

Palavras-chave em inglês:

Aeromonas sp.

Irrigation water

Vegetables

Virulence

Antimicrobial resistance

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Dirce Yorika Kabuki [Orientador]

Ana Lúcia Penteado

Graciela Fujimoto

Data de defesa: 20-04-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki
Orientadora
DCA - FEA / UNICAMP

Dra. Ana Lucia Penteado
Membro Titular
EMBRAPA - Jaguariúna

Profa. Dra. Graciela Fujimoto
Membro Titular
Faculdade de Tecnologia do Estado de São Paulo - Capão Bonito/SP

Profa. Dra. Nathalia Cristina Cirone Silva
Membro Suplente
DCA - FEA / UNICAMP

Dr. Rafael Djalma Chavez
Membro Suplente
DCA - FEA – UNICAMP

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

*Dedico aos meus avós e aos meus pais **Maria José e Elio**, que sempre me amaram, incentivaram e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela mensagem enviada a cada amanhecer – “é uma nova oportunidade para que você faça valer a pena!”.

À **Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki**, pela valiosa orientação, ensinamentos, aconselhamentos e apoio, essenciais para meu desenvolvimento pessoal e acadêmico, e pela confiança depositada em mim.

Ao meu avô **Arlindo** (*in memorian*), que está olhando lá de cima com seu sorriso contido, mas cheio de orgulho pela conclusão de mais uma etapa e à minha avó **Natalina** (*in memorian*) que me ensinou uma das mais valiosas lições que já pude aprender e praticar: “é necessário paciência em tudo que se faz na vida”.

Aos meus pais, a quem agradeço pelo apoio, força, companhia e pelos vários exemplos que me dão a cada dia. Amo vocês!

Aos meus avós, **Alice** e **Hélio** que me passam com tanto carinho sua experiência e claro, me alimentam muito, mas muito bem.

Ao **Pedro Marques** pela colaboração nos experimentos e ajuda com a tradução.

À **Cristiane Andrade** e **Nathalia Cirone** pela grande ajuda com o PCR. À **Verônica Ortiz** pela grande ajuda com a estatística do projeto.

À **Graciela Fujimoto** pela coleta de amostras em Capão Bonito e seu transporte até Campinas e por sempre sanar minhas dúvidas.

Aos **membros da banca examinadora** pela disponibilidade e atenção dispensada na correção do trabalho e pelas valiosas contribuições.

A todos do laboratório de Microbiologia de Alimentos que colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho, em especial à **Juliane Dias Xavier**, **Marina Vettoratto**, **Taicy Sigaki dos Santos** pela grande ajuda com a etapa de isolamento e pelo carinho que tiveram com o trabalho. Ao **Caio H. Tadashi**, pela ajuda no teste de resistência aos antimicrobianos e à **Erika Gomes** e **Taísa Pires** pela paciência ao ouvir minhas lamentações nas vezes que os testes não deram certo. Obrigada, também, à **Juliana Marques** pela ajuda no preparo dos meios de cultura. Tive a sorte de encontrar em vocês grandes amigos.

Aos meus colegas e amigos do DCA, pela amizade e parceria.

A **CAPES** pelo fomento de recursos para o projeto e ao **Centro Tropical de Culturas Andre Tosello**, **Instituto de Biologia da Unicamp** e **Fundação Oswaldo Cruz** pela doação das culturas utilizadas como padrão.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.
Muito obrigada!

RESUMO

Algumas espécies de *Aeromonas* podem causar patologias gastroentéricas, meningite, endocardite, artrite, osteomielite, infecções cutâneas e outras desordens, sendo considerados patógenos emergentes com crescente importância para a saúde pública, especialmente por serem veiculados pela água e alimentos crus. Tendo em vista esta significância, os objetivos deste projeto foram avaliar: i) a ocorrência de *Aeromonas* sp. potencialmente patogênicas em água de irrigação e vegetais de cultivo convencional, hidropônico e orgânico coletados de propriedades rurais no município de Capão Bonito-SP e em vegetais convencionais, hidropônicos e minimamente processados, comercializados na cidade de Campinas-SP; ii) o potencial patogênico dos isolados através da detecção dos genes codificadores dos principais fatores de virulência para gastroenterites (genes *aer*, codificador da aerolisina; *hlyA*, codificador da hemolisina HlyA; e *act*, *alt* e *ast* codificadores das enterotoxinas Act, Alt e Ast, respectivamente) e iii) a suscetibilidade das cepas isoladas aos antimicrobianos gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacina, cloranfenicol, ceftioxima, clindamicina e moxifloxacina. Foram avaliadas 18 amostras de água de irrigação e 74 de vegetais do município de Capão Bonito-SP e 103 vegetais do comércio de Campinas-SP. Houve quantificação direta de *Aeromonas* sp. em 66,7% (12/18) das amostras de água de irrigação, com contagens entre 4 e $1,7 \times 10^2$ UFC.100ml⁻¹. Para os vegetais de Capão Bonito, as frequências de ocorrência de *Aeromonas* sp. nas amostras de cultivo convencional, hidropônico e orgânico foram, respectivamente, de 23,0% (6/26), 37,5% (9/24) e 45,8% (11/24) e suas contagens variaram de $<10^2$ a $4,6 \times 10^4$ UFC.g⁻¹, $<10^2$ a $4,8 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ e $<10^2$ a $4,0 \times 10^4$ UFC.g⁻¹, respectivamente. Verificou-se, ainda, *Aeromonas* sp. em alguns vegetais irrigados com água contaminada. Para os vegetais comercializados em Campinas-SP, foram detectadas *Aeromonas* sp. em 53,4% (55/103) das amostras analisadas. As frequências de ocorrência para os grupos convencional, hidropônico e minimamente processados foram, respectivamente, de 56,9% (33/58), 33,3% (5/15) e 56,7% (17/30). As contagens variaram de $<10^2$ a $3,4 \times 10^6$ UFC.g⁻¹, $<10^2$ a $3,6 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ e $<10^2$ a $2,3 \times 10^4$ UFC.g⁻¹, respectivamente. O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos revelou que ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina e moxifloxacina foram os mais eficazes contra *Aeromonas*, e que clindamicina foi o menos eficaz, com 98,35% (119/121) das cepas isoladas

resistentes ao agente. Em 11,6% (14/121) isolados, observou-se perfil de resistência a dois ou mais antimicrobianos (clindamicina, tetraciclina e cefepime). O perfil genotípico de virulência de todos os isolados apresentou-se variável, revelando que 70,2% (85/121) apresentaram o gene *alt* (este de maior prevalência entre os isolados), 32,2% (39/121) o *act*, 53,7% (65/121) o *ast*, 37,2% (45/121) o *hlyA* e 45,5% (55/121) o *aer*. Em relação à capacidade de produção de β -hemolisinas verificadas em ágar sangue de carneiro, 37,4% (73/195) das amostras analisadas apresentaram isolados positivos. Estes resultados demonstram que os isolados de *Aeromonas* sp. tem potencial patogênico e podem causar doenças. Além disso, salienta a importância do uso controlado de antimicrobianos, evitando a aquisição de resistência por *Aeromonas* sp.

Palavras-chave: *Aeromonas* sp., água de irrigação, vegetais, virulência, resistência a antimicrobianos

ABSTRACT

Some species of *Aeromonas* cause gastroenteritis, meningitis, endocarditis, arthritis, osteomyelitis, skin infections and other disorders, so that, they are considered emerging pathogens with increasing importance to public health, especially because they are spread through the water and raw foods. Given that significance, this project aimed to evaluate: i) the occurrence of potentially pathogenic *Aeromonas* sp. in: irrigation water; conventionally, hydroponic and organic cultivated vegetables collected from rural properties in the county of Capão Bonito-SP; hydroponic or conventionally grown vegetables and minimally processed vegetables marketed in the city of Campinas-SP; ii) the pathogenic potential of the isolates by detection of genes encoding virulence factors for gastroenteritis (*aer* encoding aerolysin; *hlyA* encoding hemolysin, and enterotoxins genes *act*, *alt* and *ast*, encoding Act, Alt and Ast, respectively) and iii) the susceptibility of the isolates to gentamicin, tetracycline, ciprofloxacin, chloramphenicol, cefepime, clindamycin and moxifloxacin. Eighteen samples of irrigation water, 74 samples of vegetables from Capão Bonito-SP and 103 samples of vegetables from Campinas market were analyzed. Direct quantification of *Aeromonas* sp. was possible in 66.7% (12/18) of the irrigation water samples, presenting counts between 4 and 1.7×10^2 CFU.100ml⁻¹. For vegetables from Capão Bonito, the occurrence of *Aeromonas* sp. in conventional, hydroponic and organic farming samples were 23,0% (6/26), 37.5% (9/24) and 45,8% (11/24), respectively. The counts in these samples ranged from $<10^2$ to $4,6 \times 10^4$ CFU.g⁻¹, $<10^2$ to $4,8 \times 10^4$ CFU.g⁻¹ and $<10^2$ to $4,0 \times 10^4$ CFU.g⁻¹, respectively. It was also possible to find *Aeromonas* sp. in plants irrigated with contaminated water. For the vegetables acquired from the market of Campinas, *Aeromonas* sp. were detected in 53.4% (55/103) of the samples. The occurrence frequencies in conventional, hydroponics and minimally processed samples were, respectively, of 56.9% (33/58), 33.3% (5/15) and 56.7% (17/30), with counts ranging from $<10^2$ to 3.4×10^6 CFU.g⁻¹, $<10^2$ to 3.6×10^5 CFU.g⁻¹ and $<10^2$ to 2.3×10^4 CFU.g⁻¹. Antimicrobial resistance test revealed that ciprofloxacin, chloramphenicol, gentamicin and moxifloxacin were the most effective against *Aeromonas* sp., while clindamycin was the least effective with 98.35% (119/121) of isolates resistant. The resistance to two or three antimicrobial (clindamycin, tetracycline and cefepime) was observed in 11,6% (14/121) of the isolates. The genotypic profile of the isolates was variable. Virulence gene *alt* was

the most common among the isolates and was detected in 70,2% (85/121) of the isolates. Gene *act*, *ast*, *hlyA* and *aer* were found in 32,2% (39/121), 53,7% (65/121), 37,1% (45/121) *hlyA* and 45,5% (55/121), respectively. Regarding β -hemolysin production capacity, evaluated on sheep blood agar, 37.4% (73/195) of the samples showed positive isolates. These results show the virulent potential of *Aeromonas* sp. and also that they can cause diseases. In addition, emphasize the importance of the controlled use of antimicrobials in order to avoid the increase of *Aeromonas* sp. antimicrobial resistance.

Key-words: *Aeromonas*, irrigation water, vegetables, virulence, antimicrobial resistance.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características dos grupos do gênero <i>Aeromonas</i> spp.	24
Tabela 2 Contagens de <i>Aeromonas</i> sp. em ambiente aquático.....	32
Tabela 3 Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos.....	40
Tabela 4 Amostras de água coletadas na cidade de Capão Bonito-SP.....	43
Tabela 5 Amostras de vegetais coletadas de Capão Bonito-SP.....	44
Tabela 6 Classes de vegetais e respectivas quantidades coletados na cidade de Capão Bonito-SP.....	45
Tabela 7 Classes de vegetais e respectivas quantidades coletados na cidade de Campinas-SP.....	47
Tabela 8 <i>Primers</i> utilizados na identificação do gênero <i>Aeromonas</i>	51
Tabela 9 <i>Primers</i> utilizados na identificação de genes de virulência do gênero <i>Aeromonas</i>	52
Tabela 10 Concentrações de antibióticos e medidas de halos (mm) para determinação de resistência de <i>Aeromonas</i> sp. aos antimicrobianos.....	54
Tabela 11 Monitoramento climatológico da cidade de Capão Bonito-SP no período das coletas.....	56
Tabela 12 Contagens de <i>Aeromonas</i> sp. em amostras de água coletadas de produtores de Capão Bonito-SP.....	57
Tabela 13 Ocorrência de <i>Aeromonas</i> sp. em vegetais coletados no município de Capão Bonito-SP.....	59
Tabela 14 Contagens e ocorrência de <i>Aeromonas</i> sp. em hortaliças de Capão Bonito-SP no período de dezembro de 2014 a março de 2016.....	61
Tabela 15 Correlação entre amostras contaminadas de água e a frequência de <i>Aeromonas</i> sp. em vegetais coletados em Capão Bonito-SP.....	65
Tabela 16 Ocorrência de <i>Aeromonas</i> sp. em vegetais folhosos comercializados em Campinas-SP.....	66
Tabela 17 Alguns tipos de hortaliças analisados e seus respectivos cultivos e contagens e médias obtidas no período de abril a dezembro de 2015.....	68
Tabela 18 Ocorrência de <i>Aeromonas</i> sp. em vegetais coletados em Capão Bonito-SP e Campinas-SP.....	70
Tabela 19 Monitoramento climatológico da cidade de Campinas e Capão Bonito-SP no período da aquisição das hortaliças.....	71
Tabela 20 Caracterização genotípica e fenotípica dos isolados de <i>Aeromonas</i> sp. de	74

amostras de água de irrigação e de Capão Bonito-SP.....	
Tabela 21 Caracterização genotípica e fenotípica dos isolados de <i>Aeromonas</i> sp. de amostras de vegetais de Capão Bonito-SP.....	75
Tabela 22 Caracterização genotípica e fenotípica dos isolados de <i>Aeromonas</i> sp. em amostras de vegetais de Campinas-SP.....	77
Tabela 23 Distribuição de isolados de <i>Aeromonas</i> sp. produtores de β -hemolisina em amostras de água de irrigação e vegetais de Capão Bonito-SP e vegetais de Campinas-SP.....	79
Tabela 24 Frequência da suscetibilidade dos isolados de <i>Aeromonas</i> sp. resistentes, com resistência intermediária e sensíveis aos antimicrobianos testados.....	82
Tabela 25 Fenótipos de multirresistência observados entre os isolados estudados.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Cultivo convencional e por hidroponia.....	20
Figura 2 Fotomicrografia eletrônica de bactéria do gênero <i>Aeromonas</i>	23
Figura 3 Matriz de similaridade demonstrando a relação filogenética construída a partir de seis <i>housekeeping</i> genes (<i>rpoD</i> , <i>gyrB</i> , <i>gyrA</i> , <i>recA</i> , <i>dnaJ</i> e <i>dnaX</i>) para agrupamento das espécies de <i>Aeromonas</i>	26
Figura 4 Esquematização da etapa de contagem e Isolamento de <i>Aeromonas</i> sp....	48
Figura 5 Esquematização da contagem e Isolamento de <i>Aeromonas</i> sp. a partir de amostras de água utilizadas para irrigação.....	49
Figura 6 Géis de agarose após corrida de eletroforese para identificação dos genes de virulência.....	73
Figura 7 Frequência dos genes de virulência em isolados de <i>Aeromonas</i> sp. em água de irrigação de Capão Bonito-SP.....	74
Figura 8. Frequência dos genes de virulência em isolados de <i>Aeromonas</i> sp. em vegetais de Capão Bonito-SP.....	75
Figura 9. Frequência dos genes de virulência em isolados de <i>Aeromonas</i> sp. em vegetais de Campinas-SP.....	76
Figura 10. Produção de hemolisina por isolado de <i>Aeromonas</i> sp. isolada de rúcula hidropônica (P50) coletada em Capão Bonito-SP.....	79
Figura 11. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos de <i>Aeromonas</i> sp. isolada de amostra de couve higienizada comercializada em Campinas-SP.....	83

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Produção, comercialização e qualidade microbiológica de hortaliças frescas ...	20
3.2 Taxonomia e caracterização de <i>Aeromonas</i> spp.	23
3.3 Patogenicidade	27
3.3.1 Enterotoxinas (Act, Ast, Alt)	28
3.3.2 Hemolisinas (hlyA, aerA e aer)	29
3.4 Ocorrência de <i>Aeromonas</i> spp. em Alimentos.....	30
3.4.1. Ocorrência de <i>Aeromonas</i> spp. em Água	31
3.4.2 Ocorrência de <i>Aeromonas</i> spp. em vegetais frescos e outros alimentos	33
3.5 Surtos envolvendo <i>Aeromonas</i> spp	36
3.6 Suscetibilidade aos antimicrobianos	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Amostras.....	41
4.2 Contagem e detecção de <i>Aeromonas</i> sp. em vegetais.....	47
4.2.1 Contagem	47
4.2.2. Detecção.....	48
4.3 Contagem de <i>Aeromonas</i> sp. em água	49
4.4 Extração de DNA	50
4.5 Identificação dos isolados.....	50
4.6 Determinação dos genes de virulência	51
4.7 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	53
4.8 Análise estatística	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Ocorrência de <i>Aeromonas</i> sp. em água de irrigação e vegetais do município de Capão Bonito-SP	55
5.1.1. Ocorrência de <i>Aeromonas</i> sp. em água de irrigação de Capão Bonito	56

5.1.2. Ocorrência de <i>Aeromonas</i> sp. em vegetais do município de Capão Bonito-SP	59
5.2 Ocorrência de <i>Aeromonas</i> sp. em vegetais da cidade de Campinas-SP.....	66
5.3 Vegetais e sazonalidade.....	70
5.4 Perfil de virulência das estirpes de <i>Aeromonas</i> sp.	72
5.5 Suscetibilidade aos antimicrobianos.....	80
6 CONCLUSÃO	87
7 REFERÊNCIAS.....	88
APÊNDICES.....	99

INTRODUÇÃO

As políticas de segurança dos alimentos norteiam a comercialização de produtos inócuos e, ao mesmo tempo, despertam o interesse dos consumidores por alimentos nutritivos e que proveem benefícios à saúde. Aliado a isso, a busca por uma vida saudável e o apelo das autoridades de saúde pública para o consumo de produtos ricos em fibras e pobres em gordura, contribuem para o aumento da procura de frutas e vegetais. No período de 2008 a 2009, a aquisição alimentar domiciliar *per capita* anual de hortaliças foi de 27,075 kg (IBGE, 2010).

Por outro lado, as hortaliças representam um potencial veículo para a disseminação de diferentes agentes patogênicos de habitat aquático, dentre os quais se encontram as *Aeromonas*, micro-organismos que tem sua ocorrência intensificada durante períodos quentes (NOJIMOTO, 1997; PEREIRA et al., 2008).

Aeromonas são micro-organismos emergentes de potencial risco à saúde coletiva, veiculadas principalmente pela água e alimentos crus de origem animal e vegetal. Algumas espécies produzem exotoxinas e outros fatores de virulência, sendo patogênicas para os homens e animais. Os transtornos ocasionados à saúde vão de distúrbios gastrointestinais, infecções entéricas e úlceras até septicemia hemorrágica. Quando não intestinal podem causar meningites, endocardites, artrites, osteomielites, infecções cutâneas entre outros (ALTWEGG; GEISS, 1989; PALUMBO et al., 2001; GUO et al. 2014).

Não são raros os relatos em literatura sobre o isolamento de *Aeromonas* citotóxicas a partir de vegetais comercializados no varejo como aspargo, salsa, espinafre, aipo, alface, couve, brócolis, alface, escarola, couve, repolho e agrião, sendo a presença destes microrganismos verificada até mesmo em vegetais minimamente processados (ABU-OWDA; A ELMANAMA; ARAFA, 2017; ALCIDES; GUIMARAES; FERREIRA, 2003; BERRANG; BRACKETT; BEUCHAT, 1989; BURROWS; SCURRAH; SZABO, 2000; CALLISTER; AGGER, 1987, MONGE; ARIAS-ECHANDI; UTZINGER, 1998).

Aliado a isto, *Aeromonas* spp. apresentam resistência à ampicilina e às cefalosporinas de primeira geração, sendo as cefalosporinas de terceira geração, tetraciclinas e fluoroquinolonas os antibióticos mais utilizados nos tratamentos. A resistência aos antimicrobianos por estes micro-organismos deve-se, dentre outros, aos fatores ambientais e clínicos, além de produzirem β -lactamase - uma enzima que promove a resistência aos antibióticos beta-lactâmicos – e plasmídeos conjugados (LOPES, 2009).

Desta forma, tanto a contaminação microbiana quanto a presença de substâncias tóxicas em água e produtos de origem animal e vegetal podem causar transtornos à saúde do consumidor, resultando na diminuição da produtividade da população economicamente ativa e aumento de gastos públicos para atendimento de enfermidades.

Não são raros os relatos de casos de gastroenterite humana após o consumo de água e alimentos crus ou parcialmente cozidos, o que aponta para a importância de que os órgãos de Saúde Pública no Brasil sejam alertados sobre a presença desses patógenos na cadeia alimentar e seus riscos para a saúde humana (KROVACEK et, 1995; MENDES MARQUES et al., 2012; WU et al, 2014; ZHANG et al., 2012).

Diante deste cenário, este estudo baseou-se na investigação da ocorrência e caracterização do perfil de resistência aos antimicrobianos e genes de virulência de bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas* em vegetais produzidos por cultivo convencional, hidropônico e minimamente processados provenientes da cidade de Campinas e, também, de água de irrigação e vegetais de cultivo convencional, hidropônico e orgânico da região de Capão Bonito-SP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Devido à importância dos vegetais na alimentação da população, o objetivo deste trabalho é avaliar a ocorrência de *Aeromonas* sp. potencialmente patogênicas em água de irrigação e vegetais frescos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a população de bactérias do gênero *Aeromonas* presentes em água de irrigação e vegetais de propriedades rurais no município de Capão Bonito-SP e supermercados de Campinas-SP.
- b) Analisar o potencial patogênico de isolados de *Aeromonas* sp. através da detecção dos genes codificadores dos principais fatores de virulência da gastroenterite como os genes *aer*, codificador da aerolisina; *hlyA* codificador da hemolisina HlyA; e *act*, *alt* e *ast* codificadores das enterotoxinas Act, Alt e Ast, respectivamente, e consequente potencial de risco que os vegetais possam representar aos consumidores.
- c) Verificar o perfil de resistência dos isolados de *Aeromonas* sp. frente a diversos antimicrobianos - gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacina, cloranfenicol cepepime, clindamicina e moxifloxacina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção, comercialização e qualidade microbiológica de hortaliças frescas

Hortaliças são plantas alimentares que contém alto teor de vitaminas e minerais. Os sistemas utilizados atualmente para cultivo de hortaliças são os do tipo convencional, hidropônico e orgânico.

Em culturas convencionais os vegetais crescem no solo com aporte adequado de nutrientes e água, sendo utilizados fertilizantes para melhorar a produtividade das plantas. No sistema hidropônico, o solo é substituído por uma solução aquosa nutritiva contendo apenas os elementos minerais essenciais aos vegetais, utilizada principalmente para hortaliças sob cultivo protegido (Figura 1) (GRAVES, 1983; JENSEN; COLLINS, 1985; FURLANI et al., 2009).



Figura 1. Cultivo convencional (A) e por hidroponia (B) Fonte: FUJIMOTO, 2015

A hidroponia tem sido utilizada com sucesso em plantios de alface pelo fato de aumentar a produtividade e o número de colheitas por ano. Além disso, dispensa a rotação de culturas, reduz os gastos com defensivos agrícolas, origina um produto comercial de melhor aspecto e ocupa um menor espaço físico para o cultivo (FAVARO-TRINDADE et al., 2007).

A agricultura orgânica é norteadada pela Lei nº 10.381, de 23 de dezembro de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. As técnicas adotadas pela agricultura orgânica visam a sustentabilidade ecológica e o respeito à

integridade cultural das comunidades rurais. Dentre elas tem-se a minimização da dependência da energia não renovável, o cultivo sem materiais sintéticos, organismos geneticamente modificados e uso radiações ionizantes durante a produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente (BRASIL, 2003).

De acordo com a Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM) (2016), são produzidas ao ano no Brasil cerca de 20 milhões de toneladas de hortaliças, movimentando R\$ 55 bilhões de reais ao ano. Tomate, cebola, melancia e alface são responsáveis por 50% do total produzido. Cada brasileiro ingere, em média, 130 gramas de hortaliças por dia, sendo recomendados pela Food and Agriculture Organization (FAO), 400 gramas diárias.

Somente o Estado de São Paulo, representa 20% do volume de produção nacional, com forte presença de folhosas. Em Campinas-SP, o Mercado de Hortigranjeiros das Centrais de Abastecimento de Campinas S.A. (Ceasa), movimenta mais de 60 mil toneladas de frutas, verduras e legumes por mês, cerca de R\$ 95 milhões mensais (ABCSEM, 2016; CEASA, 2017).

O mercado de hortaliças é dinâmico e influenciado pela preferência dos consumidores. A distribuição das hortaliças é realizada em vários segmentos de mercado, como nos próprios centros de abastecimento, em sacolões, supermercados, em feiras livres e também de porta em porta (BRANDAO et al., 2015).

Tendo em vista estes expressivos números, vários autores tem estudado a ocorrência de micro-organismos em hortaliças. Favaro-Trindade et al. (2007) verificaram o efeito dos tipos de cultivo orgânico, convencional e hidropônico na qualidade de alface (*Lactuca sativa* L.) lisa, cultivar Luisa. As alfaces foram plantadas ao final do inverno e as coletas realizadas em setembro, após 50 dias do plantio para as hidropônicas e convencionais (cultivo em Pirassununga-SP - latitude 21.9846°, longitude 47.3348° e altitude 598 m) e após 75 dias para as orgânicas (cultivo em Itobi-SP - latitude 20.8167°, longitude 49.6333° e altitude 458 m).

Os autores utilizaram sementes de um mesmo lote para plantio da hortaliça e verificaram a qualidade microbiológica das alfaces através da contagem

de bactérias aeróbias mesófilas. Para as alfaces orgânicas e convencionais as contagens foram em torno de 10^6 UFC.g⁻¹, enquanto que para as hidropônicas foram de $3,0 \times 10^4$ UFC.g⁻¹.

Outro fator determinante da qualidade de uma hortaliça é o tempo e a temperatura sob a qual é exposta para comercialização nas gôndolas dos supermercados. A presença de micro-organismos psicrotróficos, como as *Aeromonas*, propicia a deterioração dos vegetais mesmo sob refrigeração a 5°C (CALLISTER; AGER, 1987).

Callister e Agger (1987) estudaram a presença de *Aeromonas* spp. em salsa, espinafre, aipo, brotos de alfafa, brócolis e alface, comercializados na cidade de La Crosse - Wisconsin (EUA) sob temperatura de 5°C num período de 14 dias de armazenamento e verificaram que houve aumento de 10 a 1000 vezes do número de células, com contagens iniciais variando de $<10^2$ a $2,3 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ e finais de $<10^2$ a $>10^5$ UFC.g⁻¹.

Embora se acredite que *Aeromonas* spp. estejam presentes em baixos níveis em vegetais minimamente processados, Jacksens et al. (1999) demonstraram que a atmosfera modificada e o processo de cloração dos vegetais podem não ser efetivos para evitar o aumento das elevadas contagens durante o processamento e armazenamento, representando um potencial perigo biológico para os vegetais minimamente processados.

Conforme estudo realizado na Bélgica por Uyttendaele et al. (2004), apesar de *Aeromonas caviae* e *hydrophila* mostrarem-se resistentes ao processo de cloração da água, são sensíveis ao ácido láctico na concentração de 2% após exposição à solução por um minuto. As contagens destes micro-organismos foram reduzidas de aproximadamente 4,5 para <1 log UFC.ml⁻¹.

3.2 Taxonomia e caracterização de *Aeromonas* spp.

O gênero *Aeromonas* compreende bastonetes Gram negativos, medindo de 0,3 a 1,0 μm de diâmetro por 1,5-3,5 μm de comprimento, ocorrendo isolados, em pares ou em pequenas cadeias (Figura 2). São anaeróbios facultativos, pertencentes à família *Aeromonadaceae* da classe das Gamma-proteobacterias (EPA, 2006).

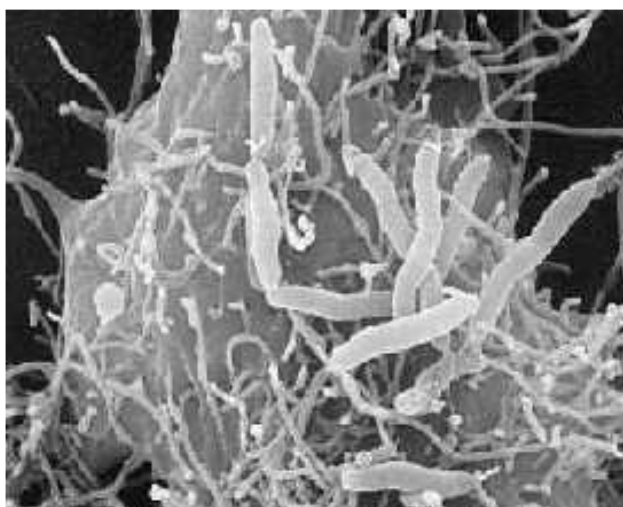


Figura 2. Fotomicrografia eletrônica de bactéria do gênero *Aeromonas* (Fonte: EPA, 2006)

De acordo com o Manual de Bergey (MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S.W. 2005), o gênero *Aeromonas* era classificado como membro da família *Vibrionaceae*. Entretanto, estudos realizados por Colwell, Macdonell e Ley (1986) demonstraram que filogeneticamente o gênero não se enquadrava exatamente nesse grupo e, com base em evidências genéticas e moleculares (análises secundárias dos genes 16S RNAr, 5S RNAr e pelos resultados de hibridização do DNA-RNA), sugeriram a criação de uma nova família, denominada de *Aeromonadaceae* (POPOFF et al., 1984).

Em 2001, o Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana aceitou a proposta do Subcomitê Internacional de Taxonomia de *Vibrionaceae* para criação da família *Aeromonadaceae*. Esta família foi então incluída na última edição do Manual Bergey, a qual lista três gêneros como pertencentes a essa família: *Aeromonas*, *Oceanimonas* e *Tolumonas* (JANDA; ABBOT, 2010).

O gênero *Aeromonas* se divide em dois grupos: psicrófilas e mesófilas, cujas principais características são apresentadas na Tabela 1. O grupo das *Aeromonas* mesófilas inclui espécies potencialmente patogênicas para o homem. A maioria das espécies de *Aeromonas* cresce entre 5 a 41°C, sendo *A. hydrophila* capaz de crescer a temperatura de 4°C (POPOFF, 1984; ABBOTT, 2010).

De forma geral, as condições ótimas de crescimento são 30°C, pH entre 7 e 9 e atividade de água de aproximadamente 0,99 (EPA, 2006). Entretanto, há relatos de que à temperatura de 5°C, as espécies de *Aeromonas* são capazes de produzir citotoxinas e hemolisinas (MAJEED; EGAN; MAC RAE, 1990).

Tabela 1. Características dos grupos do gênero *Aeromonas*

Grupo	Temperatura de crescimento (°C)	Temperatura ótima de crescimento (°C)	Principais representantes
<i>Aeromonas</i> psicrófilas	5 a 35	22-25	<i>salmonicida</i> e <i>A. media</i>
<i>Aeromonas</i> Mesófilas	5 a 41	35-37	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. veronii</i> biotipo <i>sobria</i> , <i>A. caviae</i> e <i>A. schubertii</i>

Fonte: EPA (2006)

Aeromonas tem ampla distribuição geográfica e circulação ambiental, sendo encontradas majoritariamente em ambientes aquáticos (dulcícola e marinho) não necessitando de um hospedeiro humano ou animal para se desenvolver e multiplicar. A doença humana geralmente é adquirida através do consumo de água e de alimentos contaminados e tem sido relacionada como causa de diarreia do viajante (ROCHA, 2004).

Atualmente, são relatadas pela literatura 36 espécies do gênero *Aeromonas*, que são agrupadas de acordo com o sequenciamento do RNAr 16S conforme a árvore filogenética demonstrada na Figura 3. Recentemente foram identificadas quatro espécies oriundas de isolados clínicos e ambientais, diferenciadas das espécies catalogadas pela análise da sequência do gene *rpoD*. Entretanto, as espécies encontradas com maior frequência no ambiente são *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* e *A. veronii* (FIGUEIRAS et al., 2017; PEREIRA et al., 2008; JANDA; ABBOTT, 2010).

Dentre as espécies deste gênero, *A. hydrophyla* é um patógeno emergente de potencial risco à saúde coletiva, veiculado por água e diferentes tipos de alimentos de origem animal e vegetal. Esta espécie tem sido associada a complicações como meningite, osteomielite, infecções entéricas e úlceras, infecções oculares e septicemia hemorrágica ou assintomática (ALTWEGG; GEISS; FREIJ, 1989; PALUMBO et al., 2001; GUO et al. 2014).

Também há relatos em literatura de infecções cutâneas causadas por *Aeromonas hydrophila/caviae* pelo contato com água contaminada. Bryant, Babl e Daley (2016) relataram foliculite bacteriana desenvolvida por quatro crianças que nadaram em piscina com água de torneira sem tratamento químico.

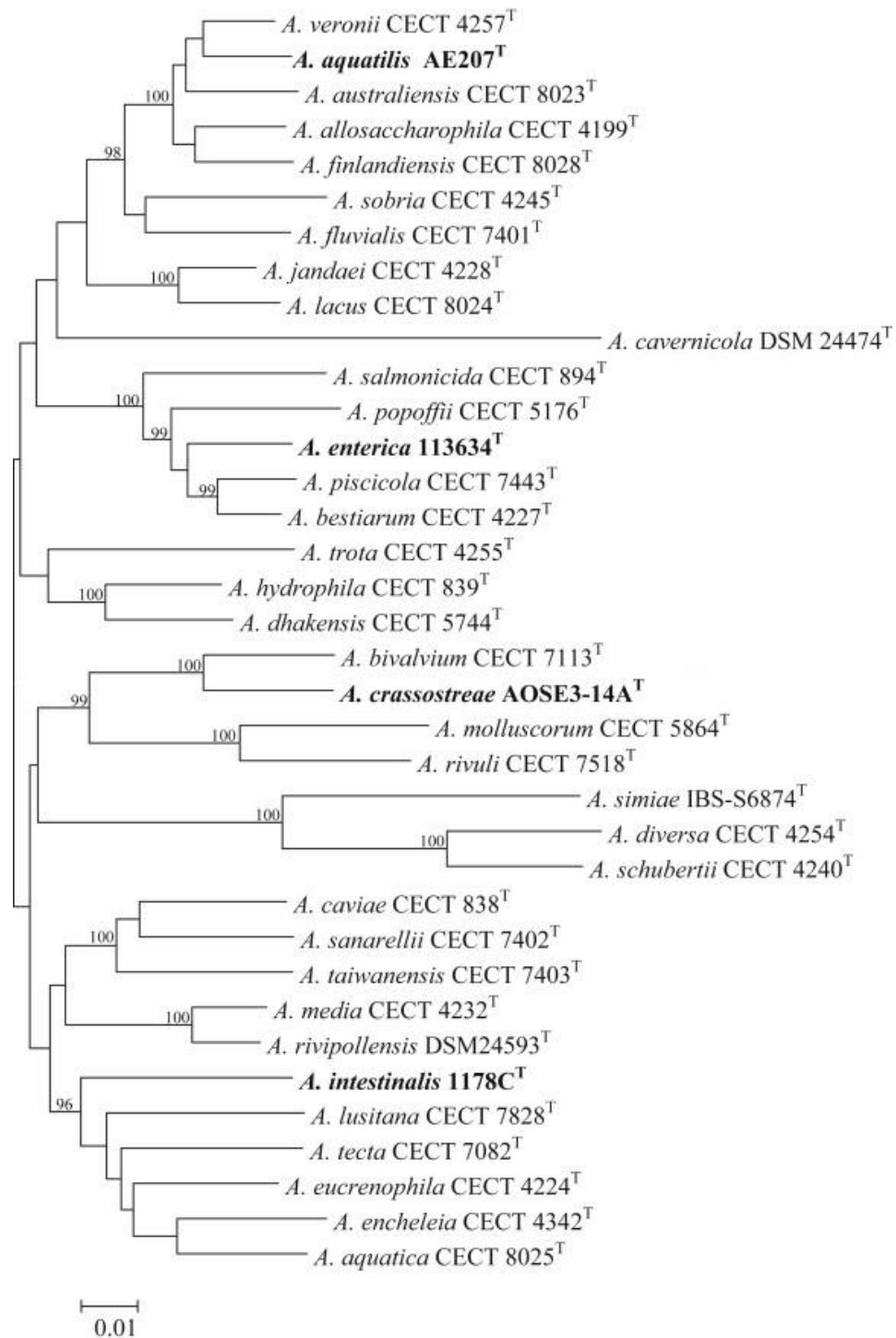


Figura 3. Matriz de similaridade demonstrando a relação filogenética construída a partir de seis housekeeping genes (*rpoD*, *gyrB*, *gyrA*, *recA*, *dnaJ* e *dnaX*) para agrupamento das espécies de *Aeromonas*.

Fonte: adaptado de Figueiras et al. (2017)

3.3 Patogenicidade

Devido ao fato de bactérias do gênero *Aeromonas* serem micro-organismos ubíquos veiculados pela água e alimentos crus, algumas espécies deste gênero são considerados importantes patógenos causadores de transtornos principalmente à saúde dos seres humanos e à economia da piscicultura (BARROCO, 2013).

Quatro espécies têm sido frequentemente isoladas de fezes humanas em casos de gastroenterites: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* sorotipo *sobria* e *A. trota* (NAHARRO et al., 2011). A forma mais frequente da doença é caracterizada por diarreia aquosa com febre baixa e dores abdominais. Em casos menos frequentes ocorre disenteria e colite (que incluem dores abdominais com muco e sangue nas fezes) (JANDA; ABBOTT, 2010).

Define-se como patogenicidade ou virulência a capacidade que tem um micro-organismo de causar infecção em um hospedeiro e como fator de virulência o produto do metabolismo bacteriano ou estratégia utilizada pela bactéria para causar um processo infeccioso em um ponto específico, definindo a malignidade da doença (WOLF, 2012).

Entretanto, a produção de alguns poucos fatores de virulência não bastam para explicar o porquê algumas bactérias podem causar doença e outras não, visto que a resposta depende da interação entre a bactéria e seu hospedeiro (JANDA; ABBOTT 2010).

Os indivíduos mais afetados por *Aeromonas* spp. tem idade inferior a sete e superior a sessenta anos. A dose infectante de *A. hydrophila* para acometimento da saúde de humanos e animais é maior que 10 log UFC, embora existam relatos de que taxas entre 6 e 9 log UFC comprometem a saúde de alguns indivíduos (AGGER; MCCORMICK; GURWITH, 1985; MORGAN et al., 1985; CANADA, 2012).

Os fatores de virulência envolvidos no processo de infecção por *Aeromonas* são multifatoriais, mas seu mecanismo de ação ainda não é bem conhecido. Ao invadir o hospedeiro, estes micro-organismos competem com a microbiota normal no trato gastrointestinal através da elaboração de produtos do seu metabolismo e compostos semelhantes às bacteriocinas e aderem ao lúmen

intestinal colonizando-o. Tal processo envolve as etapas de: localização direta, adesão no epitélio intestinal, formação de biofilmes, colonização, elaboração de fatores de virulência e infecção (ZONG et al., 2002).

A identificação dos genes de virulência carregados por uma bactéria é imprescindível para determinação do potencial de patogenicidade de diferentes micro-organismos. Dentre os fatores identificados através de genes expressos no material genético de *Aeromonas* tem-se: enterotoxina citotônica termolábil, enterotoxina citotônica termoestável, enterotoxina termolábil citotóxica, aerolisina, flagelos A e B, lipase, elastase, serina protease, toxina Adp- ribosiltransferase e DNases (PUTHUCHEARY; PUAH; CHUA, 2012).

Aeromonas podem produzir toxinas com atividade hemolítica, citotóxica e enterotóxica. As estruturas e proteínas codificadas pelos prováveis genes de virulência de *Aeromonas* pesquisados nesse estudo - genes *aer*, codificador da aerolisina; *hlyA* codificador da hemolisina HlyA; e *act*, *alt* e *ast* codificadores das enterotoxinas Act, Alt e Ast, respectivamente - são apresentadas de forma mais detalhada a seguir.

3.3.1 Enterotoxinas (Act, Ast, Alt)

O potencial patogênico do gênero *Aeromonas* tem sido associado a diferentes enterotoxinas, com ações distintas. Após se estabelecer no trato intestinal, *Aeromonas* podem causar diarreia pela produção das enterotoxinas: citotônicas – Alt e Ast e as citotóxicas – Act, Aerolisina e HlyA (CHOPRA; HOUSTON, 1999; VON GRAEVENITZ, 2007).

As enterotoxinas citotônicas identificadas em *Aeromonas* spp. provocam danos semelhantes em células intestinais. Alt é termolábil a 56°C, promove a elevação dos níveis do AMP cíclico (molécula responsável por transdução de sinais celulares) e prostaglandinas em células ovarianas de hamster chinês e células do epitélio intestinal, resultando na secreção de fluidos a partir de células intestinais de ratos. Já a enterotoxina Ast é termoestável a 56°C e também promove secreção em células intestinais. Ao contrário da toxina Act, as enterotoxinas citotônicas não

causam a degeneração das criptas e vilosidades do intestino delgado (JAMES, 2005; SHA; KOZLOVA; CHOPRA, 2002).

Considera-se a enterotoxina Act o mais importante fator de virulência associado ao gênero *Aeromonas*, por possuir atividade enterotoxinogênica, hemolítica e citotóxica, demonstrando semelhança com a toxina colérica (JAMES, 2005; KHAJANCHI *et al.*, 2010).

3.3.2 Hemolisinas (hlyA, aerA e aer)

Proteínas com atividade hemolítica são importantes para a patogenicidade das *Aeromonas*. Este gênero produz dois tipos de hemolisinas: α e β -hemolisina. A primeira é secretada durante a fase estacionária bacteriana e age causando lise incompleta dos eritrócitos. A segunda, mais importante para a virulência de *Aeromonas* spp., é produzida na fase de crescimento microbiano, causando a lise e destruição completa dos eritrócitos pela formação de poros na membrana celular (GALINDO *et al.*, 2006).

Existem vários tipos de β -hemolisina, sendo mais exploradas pela literatura a aerolisina (*aerA*), a enterotoxina citolítica (*aer*) e a hemolisina (*hly*). A aerolisina de *A. hydrophila* (*aerA*) é secretada como um precursor inativo, denominado proaerolisina. A proaerolisina é uma proteína de 470 aminoácidos, altamente solúvel e com massa molecular de 52 kDa. A *aerA* interage com proteínas, dentre elas as do eritrócito e linfócito. O precursor pro-aerolisina é ativado proteoliticamente no intestino em solução por enzimas digestivas. A aerolisina ativada oligomeriza formando uma estrutura em anel capaz de se inserir na membrana da célula eucariótica e formar poros transmembrana, provocando uma série de eventos intracelulares que evoluem para a morte celular (FIVAZ *et al.*, 2001). O segundo tipo de β -hemolisina encontrada em muitas espécies de *Aeromonas* é a HlyA, comum em estirpes de *A. hydrophila*, com menor frequência em *A. caviae* (35%), *A. veronii* (12%), *A. trota* e *A. jandaei*. A toxina HlyA constitui-se de 621 aminoácidos e massa de 69 KDa (HEUZENROEDER, WONG e FLOWER, 1999; JANDA e ABBOTT, 2010).

Outra enterotoxina com atividade hemolítica considerada como um dos principais fatores de virulência de *Aeromonas* é a enterotoxina citolítica (aer), codificada pelo gene *aer*. São proteínas formadoras de canais, com massa molecular de 50 a 52 KDa, termolábil, com atividade citotóxica, enterotóxica, hemolítica e letal. Em outras palavras, esta enterotoxina é capaz de induzir a formação de poros na membrana celular, seguido de seu rompimento (por ruptura de barreiras de permeabilidade) e lise celular, com vazamento de componentes intracelulares e consequente acúmulo de fluido no intestino (CHOPRA; HOUSTON, 1999; EPA, 2006).

3.4 Ocorrência de *Aeromonas* spp. em Alimentos

Aeromonas spp. podem ser encontradas em diversos alimentos, mas principalmente em peixes e vegetais devido ao fato destes terem contato direto com a água - principal veículo de transmissão e contaminação pelo gênero. *A. salmonicida*, *A. hydrophila* e *A. veronii* são patógenos de peixes (JANDA; ABBOTT, 2010).

As espécies mais comumente isoladas de amostras clínicas, água e alimentos, são *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar *sóbria*. A espécie *A. salmonicida* é frequentemente isolada de alimentos, mas raramente de água e amostras clínicas (STRATEV; VASHIN; RUSEV, 2012).

Estas bactérias têm a água como seu habitat natural e crescem numa ampla faixa de temperatura – entre 0° C e 45°C com ótima de 22°C a 32°C, fato que explica sua ocorrência em várias contagens em água de beber (JANDA; ABBOTT, 2010).

Ainda de acordo com a temperatura, alguns estudos apontam a influência da sazonalidade no desenvolvimento de *Aeromonas* spp. em uma matriz alimentícia. De acordo com Pereira et al. (2008), as elevadas temperaturas ambientais no verão contribuem para maiores índices de isolamento destes patógenos de diversas fontes.

Outros fatores que afetam a taxa de crescimento destes micro-organismos são a disponibilidade de nutrientes e a atividade de água. *Aeromonas* spp. têm sido isoladas de uma variedade de alimentos como legumes, carnes e produtos lácteos, (incluindo alimentos refrigerados devido à sua capacidade de crescer em baixas temperaturas). Podem produzir toxinas, o que torna alto o risco de toxi-infecções alimentares (CARVALHO, 2010).

3.4.1. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em Água

A qualidade da água é avaliada atualmente através de indicadores de contaminação fecal (principalmente *Escherichia coli*). Entretanto, os surtos de doenças relacionadas à água contaminada ocorrem em todo o mundo devido à presença de patógenos emergentes de importância crescente, como as *Aeromonas* (BRASIL, 2011; TEUNIS; FIGUERAS, 2016).

As *Aeromonas* têm a água como habitat natural, na qual se proliferam a baixas temperaturas. Estes micro-organismos também podem formar biofilmes em tubulações, motivo pelo qual sobrevivem em água clorada em elevadas concentrações (FIGUERAS; BORREGO, 2010).

Diversos estudos apontam a presença de espécies deste micro-organismo em ambientes aquáticos com elevada ou baixa disponibilidade de nutrientes (PEIXOTO et al., 2012; VENTURA et al., 2015, ODEYEMI; AHMAD, 2017). Contagens típicas de *Aeromonas* sp. em ambientes aquáticos estão descritos na Tabela 2.

Estas pesquisas são importantes para se determinar o risco que a água pode representar à saúde humana, visto que espécies de *Aeromonas* podem carrear diversos fatores de virulência, sendo causadoras de desordens que vão de gastroenterites a septicemia (MENDES-MARQUES et. al, 2012; PAPADAKIS et al., 2012).

Tabela 2. Contagens de *Aeromonas* sp. em ambiente aquático

Ambiente	Contagem (UFC.ml⁻¹)
Rios claros, lagos e reservatórios	<10 - 10 ²
Água para consumo após o tratamento	10 ¹ - 10 ²
Água de consumo em sistema de distribuição	10 ² - 10 ³
Lençol freático / água de poço	<10
Água de irrigação	10 ² – 10 ⁴

Fonte: PIANETTI et al., 2004; MARTINS, 2005.

Nesta linha, diversos autores têm estudado a presença destes patógenos na água. Em 1994, Bonilha e Falcão analisaram água de irrigação na cidade de Araraquara-SP e verificaram a presença de *Aeromonas hydrophila* em 2% (1/50) das amostras analisadas. Apesar da baixa incidência, a cepa isolada apresentou multi resistência aos antibióticos eritromicina, penicilina, ampicilina, cefalotina, cefadroxil, novobiocina e sulfazotrim.

Também há relatos do isolamento de *Aeromonas* spp. de água mineral engarrafada, água destilada e água de nascente. Em água destilada *A. hydrophila* pode sobreviver entre 30 a 60 dias e em água de nascente por aproximadamente sete meses. Nesta última fonte, as contagens são diminuídas em 1 log UFC nas primeiras 24 horas, 3 log UFC em 90 dias e 6 log UFC em 150 dias (EPA, 2006).

Ainda sobre o isolamento de *Aeromonas* spp. em água destinada ao consumo humano, Scoaris et al. (2008) verificaram a presença de *Aeromonas* spp. em vários pontos hídricos do município de Maringá-PR. Também foram coletadas amostras de água mineral engarrafadas de diferentes marcas em supermercados da cidade, além de amostras de água de poços artesianos e de torneira. Constatou-se a presença de *Aeromonas* spp. em 12,7% (6/47) de águas engarrafadas, 8,3% (2/23) de poços artesianos e 11% (11/167) de água de torneira. Dentre as espécies identificadas, verificou-se a presença de *A. hydrophila* e *A. jandaei*.

Em outra pesquisa igualmente relevante para a segurança alimentar, Latif-Eugenín et al. (2017) detectaram *Aeromonas* spp. em 63,6% (7/11) das amostras de águas residuais para irrigação. Também observaram a incidência destes micro-organismos em vegetais irrigados por esta água. *A. caviae* foi a espécie encontrada com maior frequência na água de irrigação e vegetais, indicando que a água é um veículo de transmissão destes patógenos para os vegetais.

Entretanto, *A. sanarellii* foi encontrada apenas em amostra de vegetal, podendo ser proveniente do solo.

Odeyemi e Ahmad (2017), verificaram a presença de *Aeromonas* spp. em água do mar na cidade de Malaca, na Malásia. Os resultados do estudo confirmaram a presença de cepas de *Aeromonas* com multi resistência a antibióticos, o que reflete o uso indiscriminado de antimicrobianos, colocando em risco a saúde de animais aquáticos e do homem devido ao risco de infecções cutâneas e ingestão do micro-organismo, respectivamente.

3.4.2 Ocorrência de *Aeromonas* spp. em vegetais frescos e outros alimentos

A exemplo da água, a ocorrência de *Aeromonas* spp. em vegetais configura à saúde humana um potencial risco para infecções causadas por este patógeno pelo fato da maioria dos vegetais folhosos serem consumidos crus ou utilizados para decoração de pratos quentes.

Ademais, existe a problemática de que a refrigeração não previne o crescimento de *Aeromonas* sp., bastando um pequeno aumento da temperatura para uma rápida propagação do gênero (MONGE; ARIAS-ECHANDI; UTZINGER; 1998). Sendo assim, diversos autores tem pesquisado a ocorrência deste patógeno em hortaliças em diversos países.

Em La Crosse, cidade localizada em Wisconsin (EUA), Callister e Agger (1987) verificaram a presença de *Aeromonas* spp. em amostras de espinafre, brócolis, alface, salsa e aipo expostos em gondolas de supermercados. Observou-se a presença de *A. hydrophila* e *A. caviae* em 48% (29/61) e 26% (16/61) das amostras vegetais analisadas, respectivamente. Num período de duas semanas houve o aumento das contagens de *Aeromonas* spp. entre 10 a 1000 vezes durante o armazenamento a 5°C. Ademais, *Aeromonas* citotóxicas foram observadas em 92% das amostras, sendo este produto presente em todas as espécies de *A. hydrophila* isoladas e em 6% das espécies de *A. caviae*. Das cepas produtoras de citotoxinas, 90% eram produtoras de hemolisina.

Um estudo realizado na Costa Rica no primeiro trimestre de 1997 apontou *Aeromonas* spp. em 30% (15/50) de folhas de coentro, 52% (26/50) de alface e 46% (23/50) de aipo. Destes isolados, 45% eram produtores citotoxinas. As cepas de *A. hydrophila* isoladas apresentaram características citotoxigênicas, enterotoxigênicas e hemolíticas. Apesar da diferença climática entre os meses de janeiro para fevereiro e março (de frio e ventoso para quente e ensolarado), não houve diferença para o isolamento da bactéria. Conforme exposto por Callister e Agger (1987), *Aeromonas* spp tem caráter psicrófilico, sendo seu crescimento a 5°C significativo (MONGE; ARIAS-ECHANDI; UTZINGER; 1998).

Alcides e colaboradores (2003) isolaram *Aeromonas* sp. de amostras de salsa e agrião adquiridas em mercados de rua no Rio de Janeiro. As análises foram realizadas no momento da compra e após sete dias de armazenamento a 5°C, com período analítico de um ano (início em outubro). No total foram isoladas 39 cepas de *Aeromonas*, sendo majoritariamente detectadas *A. caviae*. Das *Aeromonas* spp. isoladas, 51,5% apresentaram caráter enterotoxigênico, 48,5% hemolítico, e 100% apresentaram atividade da protease.

McMahon e Wilson (2001) verificaram a ocorrência de enteropatógenos e *Aeromonas* em vegetais orgânicos comercializados em grandes supermercados de diversas regiões na Irlanda do Norte. Espécies de *Aeromonas* foram isoladas de 34% (29/86) dos vegetais analisados. Dos vegetais analisados, 64% (55/86) enquadravam-se na classe de minimamente processados, dos quais isolou-se *Aeromonas* spp. de 41% (22/55) das amostras analisadas. As espécies mais comumente isoladas foram *A. schubertii*, em 21,0% de todas as amostras contaminadas, seguido de *A. hydrophila* em 5,8%, *A. trota* em 5,8%, *A. caviae* em 3,5% e *A. veronii* biovar *veronii* em 2,3% (MCMAHON; WILSON, 2001).

Júnior et al. (2001) averiguaram a ocorrência de *Aeromonas* spp. em alguns pontos do sistema hídrico empregado em um matadouro bovino, do interior de São Paulo. Após análises, os resultados foram positivos para contaminação nas amostras dos currais e água de lavagem das carcaças, principalmente das espécies *A. hydrophila* e *A. caviae*. Estirpes de *A. hydrophila* e *A. caviae* produtoras de enterotoxinas também foram identificadas em mãos de manipuladores, antes do

início das atividades, bem como na carne pronta para consumo em indústrias de alto nível higiênico-sanitário.

Aeromonas também foram isoladas de outros produtos alimentícios. Na Austrália, Ibrahim e MacRae (1991) verificaram a presença de *Aeromonas* em amostras de carne bovina (60%), de carneiro (58%), suína (74%), e leite (26%) em associação com *Listeria* spp. Na Índia, Yadav e Verma (1998), apontaram a presença de *Aeromonas* em peixe, leite pasteurizado e aromatizado e sorvete. Walker e Brooks (1993) detectaram *Aeromonas* em peixe. Outros autores isolaram *Aeromonas* de queijo e leite cru (MELAS et al., 1999) e peixes e frutos do mar (HANNINEN et al., 1997), e comidas prontas para consumo (HUDSON; AVERY, 1994).

Nagar, Shashidhar e Bandekar (2011) analisaram amostras de brotos vegetais prontos para comer em lojas de Mumbai – Índia, de janeiro de 2006 a março de 2008. Do total de brotos vegetais analisados, 2,5% foram positivos para a presença de *Aeromonas*.

No Brasil, estudos revelaram o isolamento de *Aeromonas* spp. de fontes como o ecossistema marinho, amostras de solo, pescados, mariscos, vegetais e também a partir de infecções em animais domésticos, mamíferos marinhos e animais de sangue frio. Cepas de *A. hydrophila* com características hemolíticas (48%) e citotóxicas (92%) também foram isoladas de alimentos prontos para consumo (STRATEV; VASHIN; RUSEV, 2012).

Pereira et al. (2004) estudaram mexilhões (*Perna perna*) no período de janeiro a dezembro de 2000 e dentre os micro-organismos analisados, verificaram a presença de *A. hydrophila* em mexilhões *in natura* e pré-cozidos em Jurujuba, no município de Niterói (RJ). Das 86 amostras de mexilhões analisadas (43 *in natura* e 43 pré-cozidos) identificou-se as espécies *A. media* (37,10%), *A. hydrophila* (15,50%), *A. caviae* (14,80%), *A. veronii* biogrupo *veronii* (11,60%), *A. sobria* (4,20%), *A. trota* (4,20%), *A. schubertii* (1,31%), *A. jandaei* (1,31%), *A. veronii* biogrupo *sobria* (0,52%) e *Plesiomonas shigelloides* (2,10%).

3.5 Surtos envolvendo *Aeromonas* spp.

Nos últimos anos houve crescente interesse em identificar as causas de gastroenterites humanas e estudar o papel das enterotoxinas e de outros fatores de virulência que induzem resposta às doenças. Isso tem proporcionado uma expansão da lista de bactérias classificadas como potenciais causadoras de toxi-infecções alimentares. Dentre elas estão as do gênero *Aeromonas*, as quais têm sido comprovadamente relacionadas a casos de gastroenterites humana (BULHOES; ROSSI, 2002; TEUNIS; FIGUEIRAS, 2016).

As espécies de *Aeromonas* associadas às doenças em humanos, baseadas na frequência que se apresentam são: *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* subsp *sobria* e com menor frequência *A. veronii* subsp *veronii*, *A. jandaei* e *A. schubertii* (JANDA; ABBOTT, 2010).

Os indivíduos mais acometidos encontram-se na faixa etária inferior a sete e superior a sessenta anos. Dentre os sintomas característicos apresentados estão: diarreia aquosa tipo “água de arroz”, com muco podendo haver presença de sangue, flatulência, dores abdominais, vômito e febre em torno de 38°C. Ao contrário de *Escherichia coli*, apenas uma pequena porcentagem de humanos são portadores de *Aeromonas* spp. (entre 0,2 a 8%), não sendo consideradas bactérias fecais (RODRIGUES, 1992).

No Brasil, casos envolvendo *Aeromonas* ainda são pouco relatados, entretanto, a literatura aponta a manifestação deste gênero principalmente em imunodeprimidos e crianças. As espécies mais encontradas são *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* sorotipo *sobria* (GHENGHESH et al., 2008 *apud* VIZZOTTO, 2009; GUERRA et al., 2007; HOFER et al., 2006; NOJIMOTO et al., 1997).

Em Goiânia (GO), foram analisadas 163 amostras de fezes de crianças abaixo de 5 anos de idade no período de 1995 a 1996 - 91 de fezes diarreicas e 72 de fezes não diarreicas. Foram isoladas as seguintes espécies: *A. caviae* (7,7%), *A. salmonicida* (6,6%), *A. sobria* (4,3%), *A. hydrophila* (2,2%) e *A. salmonicida achromogenes* (1,1%) (NOJIMOTO et al., 1997).

Em 2007, na cidade de Caxias do Sul-RS, foi relatado o isolamento *A. hydrophila*, *A. caviae*, e *A. veronii* biotipo *sobria* em 27 dos 408 pacientes internados com diarreia aguda (em sua maioria crianças e lactentes). Nas espécies isoladas, verificou-se a presença de vários genes de virulência (*aerA* - aerolisina/hemolisina, *ahpA* - serina-protease, *satA* - glicerofosfolipideo-colesterol aciltransferase, *lipA* - lipase, e *ahyB* -elastase) e fatores de virulência (hemolítico, proteolítico, atividades lipolíticas e formação de biofilmes) e a resistência das espécies isoladas a antimicrobianos (GUERRA et al., 2007).

Em diversos países tem sido apontada a ocorrência de *Aeromonas* spp. em vários produtos alimentícios. Na Suécia, em 1995, foi notificado que *A. hydrophila* acometeu 27 indivíduos que consumiram um alimento composto por camarão com maionese, patê de fígado, salsicha, presunto e salada de legumes. Após 20-34 horas, 22 destes indivíduos apresentaram dores abdominais, diarreia severa, dores de cabeça, febre, vômito e desmaio, sintomas que perduraram por dois dias. A espécie citada estava presente numa quantidade de 10^6 UFC.g⁻¹ no alimento e os testes bioquímicos revelaram sua capacidade de produzir β -hemolisina, citotoxinas, toxinas citotônicas, enterotoxinas e de aderir e invadir o epitélio intestinal (KROVACECK et al., 1995).

Na Índia, Yadav e Verma (1998), apontaram a presença de *Aeromonas* em peixe, leite pasteurizado e saborizado e sorvete. Os autores verificaram que *Aeromonas* isoladas destes produtos causaram meningite, gastroenterites, endocardites e osteomielites. Isolou Tanto dos produtos citados quanto das isolados de fezes de crianças acometidas com os transtornos acima se isolou *A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae*. Em 45 dos isolados foi detectada a produção de enterotoxinas.

Outro caso envolvendo *Aeromonas* spp. aconteceu na Tailândia, após o tsunami em 2004. As vítimas apresentaram infecções cutâneas de diversos graus devido ao contato com a água contaminada por estes micro-organismos. Dentre os 777 pacientes atendidos em 4 hospitais em Bangkok, 515 apresentaram infecção nos tecidos. *Aeromonas* spp. estavam entre os cinco principais patógenos isolados, com frequência de 22,6% (145/777), dentre as quais 16,2% correspondiam a *A. hydrophila* (104 isolados) e 6,4% a *A. veronii* supsp. *sobria* (HIRANSUTHIKUL et al., 2005).

Em 2011, na Tailândia e Myanmar, três mulheres grávidas apresentaram bacteremia por *Aeromonas* das espécies *veronii* subsp. *sobria* e *A. hydrophila*. Os sintomas relatados foram febre, dor de cabeça e abdominal e sangramento vaginal. A infecção resultou na inviabilidade do feto dessas três mulheres e uma delas faleceu após algumas semanas (TURNER et al., 2012).

Wu et al. (2014) estudaram a incidência de *Aeromonas* em uma cidade no sul de Taiwan entre os anos de 2008 e 2010. Fezes de pacientes de sete hospitais e dois centros médicos foram coletadas para o estudo em questão. Verificou-se que a média de contaminação anual por este gênero foi de 76 casos por um milhão de habitantes, sendo esta manifestação continua em todos os meses do ano, com leve aumento de casos em julho devido a temperaturas em torno de 30°C. Os autores explicam que, a exemplo dos *Vibrios*, espécies de *Aeromonas* tem suas contagens em água aumentadas durante os meses mais quentes.

Na cidade de Xingyi (China), em maio de 2012, mais de 200 estudantes apresentaram quadro de diarreia sendo que um deles teve mais de três episódios em 24 horas, com fortes dores abdominais, vômito e febre. Detectou-se a presença de *A. hydrophila* nas fezes do paciente. A investigação mostrou que os vegetais servidos no restaurante universitário foram deixados de molho por duas horas em um tanque contaminado próximo a uma vala de esgoto (ZHANG et al., 2012).

Tewari et al. (2014), verificaram a presença de *A. salmonicida* - patógeno conhecido como causador de furunculose e septicemia em peixes – em amostra de sangue de uma enfermeira que se queixava de febre, fraqueza e mal-estar há dez dias. Comparativamente com outras espécies de *Aeromonas* patogênicas, *A. salmonicida* podem ser transmitidas por fontes ambientais, peixes doentes e água. Neste estudo, *A. salmonicida* apresentou ou fator “S-layer” (para aderência em tecidos). Apesar de dados da literatura sugerirem que esta espécie não cresce a 37°C, os autores acreditam que a bactéria tenha sofrido alguma mutação que propiciou seu crescimento nesta condição.

3.6 Suscetibilidade aos antimicrobianos

A resistência bacteriana aos fármacos pode ser dividida em intrínseca ou resistência adquirida. A intrínseca é inerente às células, que impedem a ação do antibiótico e está presente em todas as espécies pertencentes a um gênero - e adquirida - que ocorre por mutação do cromossomo ou por aquisição de elementos móveis do DNA. Diferentes mecanismos de defesa podem estar presentes numa mesma espécie, gerando o fenômeno da multirresistência (PEIXOTO et al., 2012). Os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos são apresentados resumidamente na Tabela 3.

Algumas espécies de *Aeromonas* são resistentes aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos como penicilina, ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, carbenicilina e cefalotina devido à produção de β -lactamases que inibem compostos contidos nessas drogas (JANDA; ABBOTT, 2010). Em geral, a maioria das estirpes apresentam perfis de suscetibilidade aos aminoglicosídeos, cefalosporinas de terceira e quarta geração, tetraciclina, cloranfenicol, quinolonas e trimetoprim/sulfametoxazol (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005).

Sendo as *Aeromonas* patógenos de grande incidência na piscicultura, antimicrobianos da classe das quinolonas (à qual pertence a ciprofloxacina) têm sido extensivamente usados para prevenir doenças em peixes. Por permanecerem por longos períodos no ambiente, as quinolonas contribuem para o aumento da frequência de cepas de *Aeromonas* spp. com alterações cromossomais que permitem a geração de enzimas que atacam essas drogas (ALCAIDE; BLASCO; ESTEVE, 2010; GUO et al. 2014).

Tabela 3. Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos

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

Fonte: MOURA, 2010.

Sugere-se que a mudança da permeabilidade da membrana mais externa é uma das razões pelas quais as bactérias adquirem a resistência aos antimicrobianos. A membrana mais externa das bactérias Gram negativas atua como um filtro molecular para compostos hidrofílicos. Os compostos ativos selecionados por esta membrana são, em sua maioria, denominados proteínas de membrana externa (OMP). Uma das funções mais importantes das OMPs nas bactérias Gram negativas é a formação de poros, que asseguram a permeabilidade da membrana externa, essencial para a suscetibilidade a antimicrobianos (GUO et al., 2014).

Hiransuthikul et al. (2005) verificaram que as espécies de *Aeromonas* isoladas de infecções cutâneas de pacientes vítimas do tsunami eram sensíveis à classe dos amiglicosídeos, às terceiras e quartas gerações das cefalosporinas, quinolonas e imipenem e resistentes à amoxicilina-cluvanato e à primeira geração das cefalosporinas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto em questão é vinculado ao projeto intitulado: “Fatores de risco associados à incidência de *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC) e *Aeromonas* spp. em águas de irrigação, frutas e vegetais do município de Capão Bonito-SP”, realizado em parceria com FATEC (Faculdade de Tecnologia de Capão Bonito).

A interação entre as duas instituições de ensino, teve como objetivo detalhar alguns dos contaminantes microbianos que podem oferecer risco à saúde do consumidor e os resultados obtidos nestes estudos poderão auxiliar na condução de pesquisas que visem o controle da incidência destes micro-organismos potencialmente patogênicos em água de irrigação e hortaliças.

O setor agrícola de Capão Bonito-SP representa aproximadamente 30% da economia da região e tem sua produção distribuída em cerca de 40% para a Companhia de Entrepósito e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), 40% para a comercialização local e os demais 20% para programas governamentais (PAA: Programa de Aquisição de Alimentos e PNAE: Programa Nacional de Alimentação Escolar) (CAPÃO BONITO, 2014 apud FUJIMOTO, 2015).

Paralelamente, realizou-se o levantamento da ocorrência de *Aeromonas* sp. em hortaliças cultivadas pelo sistema convencional e hidropônico e também em minimamente processadas prontas para consumo expostas nas gôndolas do comércio da cidade de Campinas visando a caracterização dos riscos a que os consumidores são expostos após ingestão destas verduras cruas.

4.1 Amostras

Foram avaliadas 18 amostras de água de irrigação e 74 de vegetais coletados em propriedades rurais localizadas no município de Capão Bonito-SP. Dentre os vegetais analisados, 26 foram cultivados da forma tradicional, 24 por hidroponia e 24 por agricultura orgânica. As coletas foram realizadas no período de dezembro de 2014 a março de 2016.

A coleta das amostras de água e de produtos agrícolas foi realizada, respectivamente, de acordo com o *Standard methods for examination of water and wastewater* (APHA, 2012) e *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (DOWNES; ITO, 2001).

Informações sobre as águas coletadas em Capão Bonito foram compiladas na Tabela 4. Não foi possível amostrar água em todas as propriedades agrícolas visitadas devido à dificuldade de acesso ao local de armazenamento e/ou às fortes chuvas, que tornavam o chão escorregadio, oferecendo risco de acidente.

Dentre os dez produtores que aceitaram participar da pesquisa, sete praticavam agricultura convencional, um hidropônica e dois orgânica. A Tabela 5 compila dados sobre a origem dos vegetais coletados em Capão Bonito, as águas utilizadas para sua irrigação, o tipo de vegetal, forma como foi cultivado e data de coleta. O agrupamento dos tipos e quantidades de vegetais coletados de cada cultivo é representado pela Tabela 6.

As amostras de vegetais de Campinas-SP foram adquiridas de 20 estabelecimentos da cidade (hipermercados, supermercados e minimercados bairristas). No total, 103 vegetais foram submetidos à verificação da ocorrência de *Aeromonas sp.*. Destas, 58 correspondiam ao cultivo tradicional, 15 ao hidropônico e 30 a vegetais minimamente processados (Tabela 7). Vale ressaltar que o número de amostras não foi igual para todas as classes de vegetais devido à inexistência de alguns deles nas gôndolas no período da pesquisa (de abril de 2015 a dezembro de 2015). No apêndice A tem-se o detalhamento das amostras adquiridas por data.

As amostras foram colocadas isoladas em sacos plásticos estéreis e acondicionadas em caixa de isopor com gelo para transporte até o laboratório e submetidas à análise até 24 horas após a coleta.

Tabela 4. Amostras de água coletadas na cidade de Capão Bonito-SP

Código da Amostra	Localização geográfica	Propriedade agrícola	Data da coleta	Local de coleta	Finalidade do uso
A1	24°08'22.8"	1	05/12/2014	Poço artesiano	Irrigação
A2	24°08'22.8"	1	05/12/2014	A1 armazenada em caixa plástica	Irrigação
A3	24°08'22.8"	1	05/12/2014	A1 armazenada em caixa plástica	Irrigação
A4	24°08'	2	05/12/2014	Poço artesiano	Irrigação
A5	24°08'	3	05/12/2014	Riacho	Irrigação
A6	23°43'26.1"	4	12/12/2014	Poço artesiano	Irrigação
A7	23°43'29.5"	4	12/12/2014	Água da torneira de abastecimento público	Lavagem
A8	24°08'22.8"	1	28/03/2015	Poço artesiano	Irrigação
A9	23°59'22.6"	5	28/03/2015	Água da torneira de abastecimento público	Lavagem
A10	23°59'22.6"	5	28/03/2015	Poço artesiano	Irrigação
A11	23°54'18.9"	9	15/7/2015	Poço artesiano	Irrigação
A12	23°54'18.7"	9	15/7/2015	Poço artesiano	Irrigação
A13	23°54'13.4"	9	15/7/2015	Poço artesiano	Irrigação
A14	23°54'14.0"	9	15/7/2015	Reservatório de solução nutritiva	Irrigação
A15	23°54'17.5"	9	15/7/2015	Reservatório de solução nutritiva	Irrigação
A16	23°54'13.8"	9	15/7/2015	Reservatório de armazenamento e distribuição da água	Irrigação
A17	*	10	28/03/2016	Poço artesiano	Irrigação
A18	*	10	28/03/2016	A17 armazenada em caixa d'água	Irrigação

Tabela 5. Amostras de vegetais coletadas de Capão Bonito-SP (continua)

Propriedade agrícola	Água de irrigação	Código e Vegetal	Cultivo	Data da coleta
1	A1, A2, A3	(P1) Beterraba (P2) Manjerona (P3) Couve (P4) Repolho (P5) Cebolinha	Convencional	05/12/2014
2	A4	(P6) Repolho (P7) Couve tipo manteiga (P8) Cebolinha (P9) Salsinha	Convencional	05/12/2014
3	A5	(P10) Repolho	Convencional	05/12/2014
4	A6 e A7	(P11) Cebolinha (P12) Couve tipo manteiga (P13) Cenoura (P14) Couve japonesa (P15) Alface lisa (P16) Beterraba (P17) Salsinha	Orgânico	12/12/2014
5	A9 e A10	(P18) Couve (P19) Pimenta Cambuci (P20) Alface (P21) Cebolinha japonesa (P22) Cebolinha	Convencional	28/03/2015
6	Nc	(P23) Repolho	Convencional	28/03/2015
7	Nc	(P24) Pimentão (P25) Couve (P26) Manjerição (P27) Almeirão (P28) Rúcula (P29) Alecrim (P30) Folha de abóbora (P31) Hortelã	Convencional	28/03/2015
8	Nc	(P32) Couve (P33) Alface crespa (P34) Couve flor (P35) Almeirão (P36) Batata doce (P37) Almeirão (P38) Mandioca (P39) Acelga (P40) Beterraba (P41) Alface roxa (P42) Escarola (P43) Cenoura (P44) Espinafre (P45) Alface americano (P46) Abobrinha (P47) Catalônia (P48) Almeirão	Orgânico	02/07/2015

Tabela 5. Amostras de vegetais coletadas de Capão Bonito-SP (continuação)

9	A11, A12, A13, A14, A15 e A16	(P49) Alface (P50) Rúcula	Hidropônico	15/07/2015
		(P51) Agrião (P52) Brunela		
		(P53) Alface lisa (P54) Alface		
		mimosa (P55) Hortelã		
		(P56) Almeirão (P57) Escarola		
		(P58) Alface romana		
		(P59) Mostrada (P60) Chicória		
		frize (P61) Catalônia		
		(P62) Alface crespa		
		(P63) Salsinha (P64)		
		Cebolinha (P65) Manjerição		
		(P66) Tomilho (P67)		
		Beterraba (P68) Orégano		
		(P69) Espinafre japonês (P70)		
		Couve		
		(P71) Tomate cereja		
		(P72) Alface		
10	A17 e A18	(P73) Tomate P74 – Feijão de corda	Convencional	28/03/2016

nc: não coletada

Tabela 6. Classes de vegetais e respectivas quantidades coletados na cidade de Capão Bonito-SP (continua)

Vegetal	Convencional (n)	Hidropônica (n)	Orgânica (n)
Abobrinha	Nc	Nc	1
Acelga	Nc	Nc	1
Agrião	Nc	1	Nc
Alecrim	1	Nc	Nc
Alface	1	6	4
Almeirão	1	1	3
Batata doce	Nc	Nc	1
Beterraba	1	1	2
Brunela	Nc	1	Nc
Catalônia	Nc	1	1

Tabela 6. Classes de vegetais e respectivas quantidades coletados na cidade de Capão Bonito-SP (continuação)

Vegetal	Convencional (n)	Hidropônica (n)	Orgânica (n)
Cenoura	Nc	Nc	2
Cebolinha	4	1	1
Chicória	Nc	1	Nc
Couve	4	1	3
Couve flor	Nc	Nc	1
Escarola	Nc	1	1
Espinafre	Nc	1	1
Feijão de corda	1	Nc	Nc
Folha de abóbora	1	Nc	Nc
Hortelã	1	1	Nc
Mandioca	Nc	Nc	1
Manjericão	1	1	Nc
Manjerona	1	Nc	Nc
Mostarda	Nc	1	Nc
Orégano	Nc	1	Nc
Pimenta cambuci	1	Nc	Nc
Pimentão	1	Nc	Nc
Repolho	4	Nc	Nc
Rúcula	1	1	Nc
Salsinha	1	1	1
Tomate	1	1	Nc
Tomilho	Nc	1	Nc
Total	26	24	24

n: número de amostras; Nc: não coletada.

Tabela 7. Classes de vegetais e respectivas quantidades coletados na cidade de Campinas-SP

Vegetal	Convencional (n)	Hidropônica (n)	Minimamente processada (n)
Agrião	4	Nc	4
Alface crespa	13	6	5
Alho poró	6	Nc	Nc
Almeirão	5	Nc	5
Cheiro verde	5	2	5
Couve	5	1	5
Escarola	5	Nc	Nc
Espinafre	5	Nc	Nc
Manjericão	5	Nc	Nc
Rúcula	5	6	6
Total	58	15	30

n: número de amostras ; Nc: não coletado

4.2 Contagem e detecção de *Aeromonas* sp. em vegetais

Para a contagem, unidades analíticas de 25 gramas de cada amostra de vegetal foram adicionadas a 225ml de caldo triptona de soja (TSB) (Difco), suplementado com ampicilina (Inlab) (10mg.L^{-1}) e homogeneizadas por um minuto em “stomacher”. Após homogeneização, uma diluição decimal seriada foi realizada.

4.2.1 Contagem

Foi inoculado 0,1ml da amostra homogeneizada na superfície do Ágar *Aeromonas* (Oxoid) suplementado com 5mg.ml^{-1} de ampicilina. Após a incubação das placas a 28°C por 24-48h, as colônias foram contadas, com posterior inoculação de 5 colônias características (caracterizadas por bordas esverdeadas e centro tendendo de verde escuro a cinza escuro, opacas e medindo 0,5 a 1,5mm) para *Aeromonas* em Ágar Triptona Soja (TSA) (Difco) para posterior identificação.

4.2.2. Detecção

Para detecção de *Aeromonas* sp. nos vegetais, 25 g de amostra foram homogeneizadas com 225ml de TSB com 10mg.L⁻¹ de ampicilina foram incubadas a 28°C por 18-24h. Após este período, foram inoculadas por estriamento em Ágar *Aeromonas* suplementado com 5mg.L⁻¹ de ampicilina e incubadas a 28°C por 24h. Da mesma forma, as colônias características (Figura 3), em número de até cinco por amostra, foram mantidas em Ágar Triptona Soja (TSA) para posterior identificação.

A Figura 4 esquematiza as etapas de contagem e enriquecimento das amostras vegetais com posterior isolamento para identificação bioquímica e molecular de colônias características para *Aeromonas* sp.

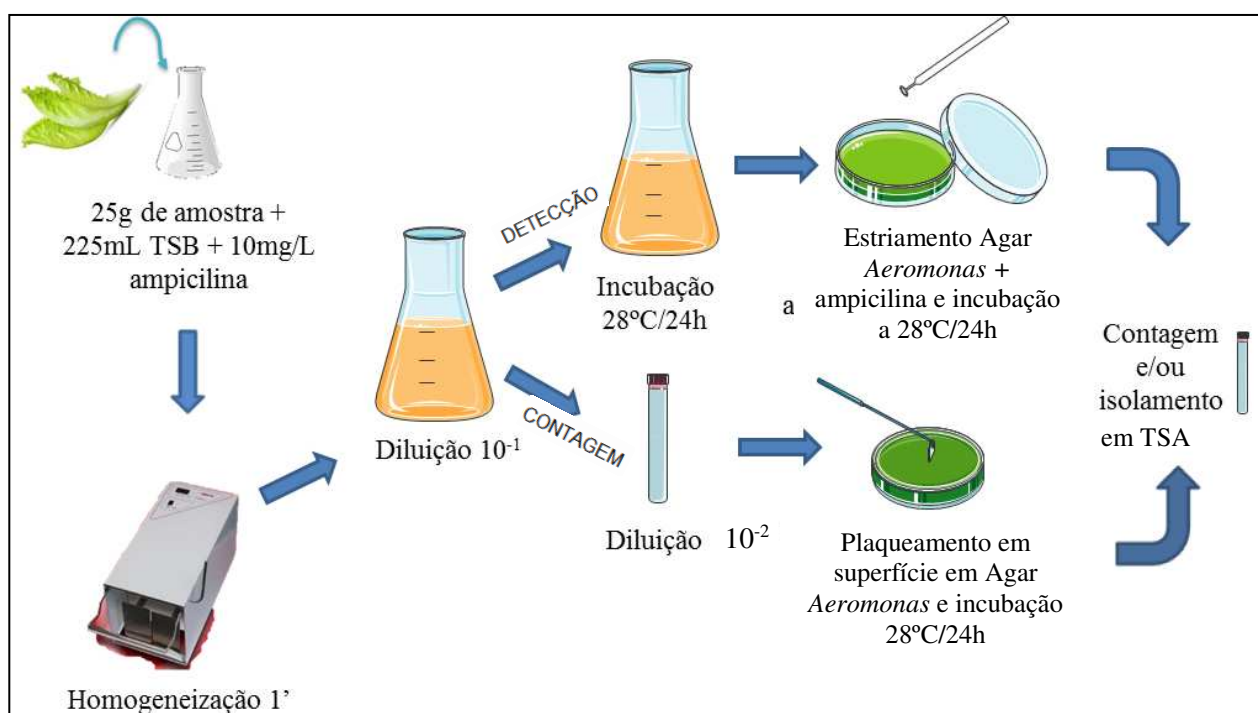


Figura 4. Esquematização da etapa de contagem e Isolamento de *Aeromonas* sp.

4.3 Contagem de *Aeromonas* sp. em água

A determinação de *Aeromonas* sp. em água baseou-se na metodologia do Comitê de Métodos Microbiológicos Canadense, intitulado de Enumeração de *Aeromonas hydrophila* em gelo e água utilizando-se Filtração por Membrana (HEALTH PRODUCTS AND FOOD BRANCH, 2012).

O método consiste na filtração de 100ml da água por um sistema de filtração utilizando-se uma membrana (HGMF ou membrana filtrante de celulose) que foi transferida para placas contendo meio de cultura TSA incubadas a 35°C por 4 horas. Em seguida, a membrana filtrante de celulose foi transferida para Ágar *Aeromonas* suplementado com ampicilina (5mg.ml⁻¹) seguindo incubação 35°C por 18-24h. Após incubação, as colônias típicas foram contadas e 5 colônias transferidas para TSA para posterior identificação, conforme Figura 5.

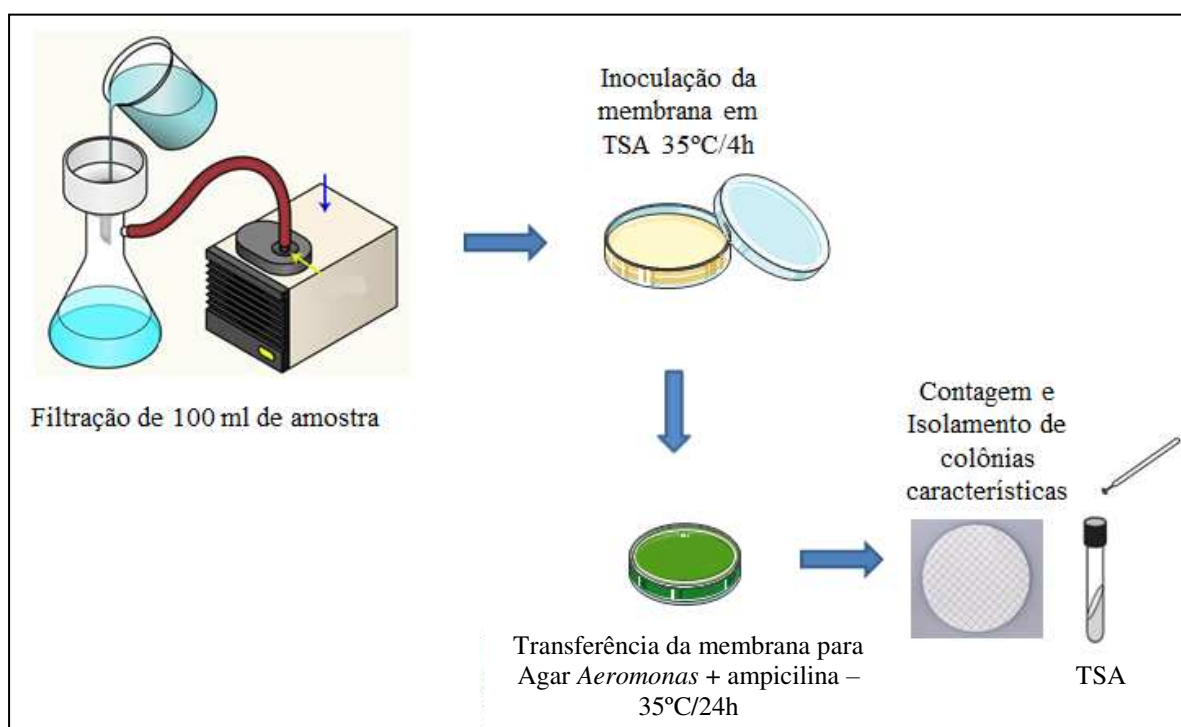


Figura 5: Esquematização da contagem e Isolamento de *Aeromonas* sp. a partir de amostras de água utilizadas para irrigação

4.4 Extração de DNA

A extração do DNA foi adaptada da metodologia para extração de *Escherichia coli* contida no Bacteriological Analytical Manual (BAM) descrita por Feng, Weagant e Jinneman (2016). O procedimento consistiu na centrifugação de 600µl da cultura ativada em caldo TSB (caldo triptona soja) após crescimento a 28°C/18-24 horas a 12000 x g por 10 minutos para separação da massa celular e sobrenadante. O sobrenadante foi dispensado e a massa celular ressuspensa em 100 µl de tampão Tris EDTA (10mM de Tris e 1 mM de EDTA). Em seguida, os microtubos foram mantidos em banho a 100°C por 10 minutos e resfriados imediatamente em banho de gelo. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 12000 x g por 1 minuto e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20°C até o momento do uso. O DNA extraído foi utilizado para a identificação ao nível de gênero e pesquisa dos genes de virulência.

4.5 Identificação dos isolados

Preliminarmente, os isolados foram submetidos à identificação de gênero *Aeromonas* através da caracterização morfológica pelo teste de Gram e bioquímica pelos testes de catalase, oxidase, fermentação do inositol, DNase e indol. Os isolados com resultados positivos para os cinco primeiros testes bioquímicos foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação do gênero *Aeromonas*.

Para confirmação do gênero a nível molecular, realizou-se um PCR-duplex, no qual foram utilizados dois conjuntos de *primers* específicos para o gênero *Aeromonas*, genes *gcat* e 16S rDNA codificadores de Glicerol fosfolipídio colesterol aciltransferase e subunidade do DNA ribossomal, respectivamente. As condições de PCR foram executadas de acordo com o método descrito por Marques (2012). A sequência dos oligonucleotídeos é apresentada na Tabela 8. A especificidade da técnica foi avaliada através de ensaios com cepas de referência: *A. hydrophila* CCT 0191 (referente ao ATCC 7966) provenientes da Coleção de Culturas Tropical

(Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia), *A. veronii* ATCC 35624 e *Aeromonas caviae* ATCC 15467 provenientes do Instituto Oswaldo Cruz e Instituto de Biologia da Unicamp, respectivamente.

Tabela 8: Primers utilizados na identificação do gênero *Aeromonas*

Primer	Sequência (5' – 3')	Gene amplificado	T (°C) anelamento	Tamanho do amplicon (bp)	Referência
<i>gcat-f</i>	5'-CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG-3'	Glicerol fosfolipídio colesterol aciltransferase	54	237	Chacón <i>et al.</i> (2002)
<i>gcat-r</i>	5'-GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT-3'				
16S-f	5'-ACGCAGGCGGTTGGATAAGT-3'	Subunidade 16S do DNA ribossomal		~600	Marques (2012)
16S-r	5'-GGCAACAAAGGACAGGGGT-3'				

Os dois genes foram analisados simultaneamente, utilizando-se uma reação de PCR multiplex com volume total de 25 µl, constituída de: 1µl de DNA molde, 0,4µM do primer *gcat* e 0,2µM do primer 16S, 10X de tampão PCR, 2,5mM de MgCl₂, 0,25mM de cada dNTP, e 2U de *Platinum Taq* DNA polimerase (Sinapse INC). As condições operacionais da PCR no termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient) foram: etapa inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto e uma etapa final a 72°C por 5 minutos (MARQUES, HOFER e LEAL, 2013).

A eletroforese dos produtos da PCR foi realizada em gel de agarose a 1,5% e corada com Sybr Safe™ (Invitrogen Life Technologies, EUA) por 30 minutos. A visualização dos produtos foi realizada através de transiluminador UV e fotodocumentados com o sistema Kodak D320.

4.6 Determinação dos genes de virulência

As cepas características para o gênero *Aeromonas* foram submetidas à verificação da presença dos genes de virulência *act*, *ast* e *alt* responsáveis, respectivamente, pela produção das enterotoxinas Act, Ast e Alt, os quais foram verificados de acordo o trabalho de Sen e Rodgers, (2004). A presença dos genes *hly* e *aer*, codificadores de hemolisina e aerolisina, respectivamente, foram

verificadas de acordo com Heuzenroeder, Wong e Flower (1999). As sequências dos primers utilizados estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9: *Primers* utilizados na identificação de genes de virulência do gênero *Aeromonas*

Produto	Primer	Seqüência (5' – 3')	Gene	Tamanho do amplicon (bp)	Referência
Enterotoxina Citolóxica	<i>Act</i>				
	F	5'AGAAGGTGACCACCAAGAACA-3'	<i>act</i>	232	Sen e Rodgers, (2004)
	R	5'AACTGACATCGGCCTTGAAGTC-3'			
Enterotoxina citotônica	<i>Ast</i>				
	F	5'-TCTCCATGCTTCCCTTCCACT-3'	<i>ast</i>	331	Sen e Rodgers, (2004)
	R	5'-GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG-3'			
Enterotoxina citotônica	<i>Alt</i>				
	F	5'-TGACCCAGTCCTGGCACGGC-3'	<i>alt</i>	442	Sen e Rodgers, (2004)
	R	5'GGTGATCGATCACCACCAGC-3'			
Hemolisina	<i>Hly</i>				
	F	5'-GGCCGGTGGCCCGAAGATACGGG-3'	<i>hlyA</i>	597	Heuzenroeder, Wong e Flower (1999)
	R	5'-GGCGGCGCCGGACGAGACGGG-3'			
Aerolisina	<i>Aer</i>				
	F	5'-GCCTGAGCGAGAAGGT-3'	<i>aer</i>	416	Heuzenroeder, Wong e Flower (1999)
	R	5'-CAGTCCCACCCACTTC-3'			

Cada reação teve um volume total de 25 µl. Os genes *act* e *ast* foram analisados simultaneamente, utilizando-se uma reação de PCR multiplex, constituída de: 1µl de DNA molde, 0,2µM do primer *act* e 0,2µM do primer *ast*, 10X de tampão PCR, 3,0mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP (Sinapse Inc), e 2U de Taq Hot Firepol (Hot Start DNA Polymerase) (Solis Biodyne).

Para o gene *alt*, utilizou-se reação de PCR, constituída de: 1µl de DNA molde, 0,2µM do primer *alt* 10X de tampão PCR, 1,5M de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP (Sinapse Inc), e 1U de Taq Hot Firepol (Hot Start DNA Polymerase) (Solis Biodyne).

As condições operacionais da PCR no termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient) para as duas reações foram: etapa inicial a 95°C por 12 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 25 segundos, anelamento a 55°C por

30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e uma etapa final a 72°C por 8 minutos (SEN; RODGERS, 2004).

Os genes *hlyA* e *aer* foram analisados separadamente através de reações de PCR contendo: 1µl de DNA molde, 0,2µM do primer *hlyA* ou *aer*, 10X de tampão PCR, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP (Sinapse Inc), e 1U de Taq Hot Firepol (Hot Start DNA Polymerase) (Solis Biodyne). As condições operacionais da PCR no termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient) para o gene *hlyA* foram: etapa inicial a 94°C por 12 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 62°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e uma etapa final a 72°C por 8 minutos. Para *aer*, as condições foram as mesmas observadas para *hlyA*, exceto a temperatura de anelamento, alterada para 52°C (HEUZENROEDER, WONG, FLOWER, 1999).

4.7 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade dos isolados confirmados para o gênero *Aeromonas* foi avaliada pelo método de difusão em disco em Ágar Mueller-Hinton (Difco), segundo metodologia descrita pela *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003). As zonas de inibição foram medidas após 24 horas de incubação a 35°C e a interpretação dos perfis de suscetibilidade realizada de acordo com o diâmetro mínimo necessário para que o antimicrobiano tenha ação inibitória.

Para os antimicrobianos gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacina e cloranfenicol utilizou-se o perfil de sensibilidade estabelecido pelo CLSI M45-A (2006) (*apud* Barroco 2013) para *Aeromonas* sp. Para os antimicrobianos ceftazidima, clindamicina e moxifloxacina foi utilizada a metodologia CLSI M100-S18 (2008). A Tabela 10 apresenta os antibióticos testados e os respectivos diâmetros de halos de inibição que caracterizam uma cepa como resistente, de resistência intermediária ou sensível a um dado agente antimicrobiano.

Tabela 10: Concentrações de antibióticos e medidas de halos (mm) para determinação de resistência de *Aeromonas* sp. aos antimicrobianos

Antimicrobianos	Concentração (µg)	Diâmetro do halo (mm)		
		R*	I*	S*
Cefalosporinas	Cefepime (30 µg)	≤ 26	27-46	≥ 47
Aminoglicosídeos	Gentamicina (10µg),	≤ 12	13-14	≥ 15
Tetraciclinas	Tetraciclina (30 µg)	≤ 14	15-18	≥ 19
Quinolonas	Ciprofloxacina (5 µg)	≤ 15	16-20	≥ 21
Fenicóis	Cloranfenicol (30µg)	≤ 12	13-15	≥ 16
Lincosamidas	Clindamicina (2 µg)	≤ 15	16-18	≥ 19
Fluoroquinolonas	Moxifloxacina (5 µg)	≤ 14	15-17	≥18

* Diâmetros dos halos de inibição para a cultura ser considerada: resistente (R), intermediária (I), sensível (S).

Todos os discos de antimicrobianos pertencem à marca Laborclin, Pinhais-PR.

Fonte: CLSI M45-A (2006) *apud* Barroco (2013); CLSI M100-S18 (2008)

4.8 Análise estatística

Para análise estatística dos dados utilizou-se o teste Qui-Quadrado (X^2). O objetivo deste teste foi avaliar a diferença entre a ocorrência de *Aeromonas* sp. entre os tipos de cultivo e a estação de coleta dos vegetais. Os dados foram tratados no software Microsoft Excel.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de água de irrigação e vegetais de cultivos convencional, hidropônico e orgânico coletadas na cidade de Capão Bonito-SP foram coletadas no período de dezembro de 2014 a março de 2016. Os vegetais de cultivo convencional, hidropônico e minimamente processados comercializados na cidade de Campinas-SP foram adquiridos no período de abril de 2015 a dezembro de 2015.

No total, foram analisadas 195 amostras (18 de água de irrigação e 177 de vegetais), das quais foram submetidos à triagem 1400 isolados. Destes, 436 apresentaram características de interesse após testes bioquímicos (catalase, oxidase, fermentação do inositol, DNase e indol). Dos 436 isolados, 121 foram confirmados como *Aeromonas* sp. através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os genes *gcat* e 16S/rDNA.

5.1 Ocorrência de *Aeromonas* sp. em água de irrigação e vegetais do município de Capão Bonito-SP

Das 92 amostras analisadas (água e vegetais), foi possível quantificar diretamente *Aeromonas* sp. em 41,3% (38/92) delas, sendo o menor valor populacional encontrado 4×10^0 UFC.g⁻¹ para amostra de água de irrigação (A12) e o maior valor populacional de $5,8 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ para amostra de rúcula hidropônica (P50).

Para auxiliar na interpretação das contagens obtidas, foram coletados dados do monitoramento climatológico da cidade de Capão Bonito-SP referentes às temperaturas máxima, mínima e média no período de cada coleta. Os dados meteorológicos são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Monitoramento climatológico da cidade de Capão Bonito-SP no período das coletas

Data de coleta das amostras de Capão Bonito-SP	Período de coleta dos dados pelo CIIAGRO	Média das temperaturas máximas	Média das temperaturas mínimas	Temperatura média
05/12/2014	04 a 07/12/2014	24,1	17,1	20,6
12/12/2014	11 a 14/12/2014	27,2	17,5	22,3
28/03/2015	26 a 29/03/2015	27,8	17,6	22,7
02/07/2015	02 a 05/07/2015	18,0	12,9	15,5
15/07/2015	13 a 15/07/2015	25,5	13,1	19,3
28/03/2016	28 a 30/03/2016	29,1	17,4	23,2

Fonte: CIIAGRO, 2017

5.1.1. Ocorrência de *Aeromonas* sp. em água de irrigação de Capão Bonito

Quantificou-se *Aeromonas* sp. em 66,7% (12/18) das amostras de água de irrigação, sendo o menor valor populacional de 4 UFC.100ml⁻¹ para a amostra A12 (proveniente de poço artesiano) e o maior valor populacional de 1,7 x 10² UFC.100ml⁻¹ para a amostra A18 (proveniente de poço artesiano armazenada em caixa d'água). As contagens obtidas para todas as amostras analisadas são apresentadas na Tabela 12.

Em 6 delas (A9, A10, A11, A13, A14 e A17) não foram recuperadas células destes micro-organismos (<1 UFC.100ml⁻¹). Entretanto, não foi realizada a etapa de enriquecimento da água, que poderia ter apontado para a ocorrência destes micro-organismos, uma vez que diversos autores verificaram *Aeromonas* sp. como bactérias dominantes na água de irrigação através de estudos envolvendo metagenômica (MCLELLAN et al, 2010; YE; ZHANG, 2011; AL-JASSIM et al., 2015 *apud* LATIF-EUGENIN, et al., 2017).

Para as demais amostras, observa-se na Tabela 12 que nos meses de dezembro e março as contagens variaram entre 5,1 x 10¹ (A5) e 1,7 x 10² UFC.100ml⁻¹ (A18) e em julho entre 4 (A12) e 9,5 x 10¹ UFC.100ml⁻¹ (A16). As médias foram ligeiramente diferentes - 7,4 x 10¹ UFC.100ml⁻¹ nos meses de dezembro e março de 2015/16 e 2,2 x 10¹ UFC.100ml⁻¹ em julho de 2015.

Tabela 12: Contagens de *Aeromonas* sp. em amostras de água coletadas de produtores de Capão Bonito-SP

Código da Amostra	Propriedade agrícola	Local de coleta	Contagem de <i>Aeromonas</i> sp. (UFC.100ml⁻¹)	Data da coleta
A1	1	Poço artesiano	1,1 x 10 ²	05/12/2014
A2	1	A1 armazenada em caixa plástica	1,5 x 10 ²	05/12/2014
A3	1	A1 armazenada em caixa plástica	9,0 x 10 ¹	05/12/2014
A4	2	Poço artesiano	8,0 x 10 ¹	05/12/2014
A5	3	Riacho	5,1 x 10 ¹	05/12/2014
A6	4	Poço artesiano	9,0 x 10 ¹	12/12/2014
A7	4	Água da torneira de abastecimento público	9,7 x 10 ¹	12/12/2014
A8	1	Poço artesiano	5,6 x 10 ¹	28/03/2015
A9	5	Água da torneira de abastecimento público	<1	28/03/2015
A10	5	Poço artesiano	<1	28/03/2015
A11	9	Poço artesiano	<1	15/7/2015
A12	9	Poço artesiano	4	15/7/2015
A13	9	Poço artesiano	<1	15/7/2015
A14	9	Reservatório de solução nutritiva	<1	15/7/2015
A15	9	Reservatório de solução nutritiva	3,0 x 10 ¹	15/7/2015
A16	9	Reservatório de armazenamento e distribuição da água	9,5 x 10 ¹	15/7/2015
A17	10	Poço artesiano	<1	28/03/2016
A18	10	A17 armazenada em caixa d'água	1,7 x 10 ²	28/03/2016

A_n: codificação das amostras de água coletadas

De acordo com os dados apresentados na Tabela 12, as temperaturas médias nos meses de dezembro 2014/16 e março de 2015 foram superiores às observadas no mês de julho/2015 e, conforme esperado, há aumento das contagens de *Aeromonas* sp. nos meses mais quentes do ano devido ao maior desenvolvimento destes micro-organismos nesta fonte propiciado pelas temperaturas mais elevadas. O ecossistema aquático é um veículo de transmissão

destes patógenos para o homem e, por isso, são relatados mais casos de gastroenterites, bacteremias e septicemia pela maior exposição à água e alimentos contaminados por *Aeromonas* spp. (JANDA; ABBOTT, 2010).

Os resultados gerados neste trabalho foram semelhantes aos de outros autores, que verificaram maior ocorrência de *Aeromonas* sp. em água de superfície em períodos quentes e a diminuição das contagens durante os períodos mais frios (BURKE et al., 1984, CHAURET, et al., 2001; VILLARI et al., 2000).

Latif-Eugenin et al. (2017) avaliaram água de irrigação em Catalônia, na Espanha. A propriedade estudada coletava água do poço tratada por cloração e radiação ultravioleta por uma mangueira para irrigar os vegetais. A água tratada não apresentou ocorrência de *Aeromonas* spp., entretanto a água utilizada para irrigação apresentou contagens médias de $3,74 \times 10^1$ UFC.ml⁻¹, indicando que ocorreu recontaminação ou, ainda, que estas bactérias não foram totalmente eliminadas, desenvolvendo-se durante o armazenamento.

Outros autores também verificaram a resistência de *Aeromonas* spp. à água clorada. Sugere-se que o desenvolvimento de *Aeromonas* spp. na água pode ocorrer devido à diminuição da concentração de hipoclorito de sódio durante o armazenamento da água em sistemas de distribuição para irrigação (UYTTENDAELE, 2004; TEUNIS; FIGUERAS, 2016). Entretanto, a adição de hipoclorito de sódio é indicada para evitar a proliferação de outros micro-organismos presentes na água (GAVRIEL, 1998; ROCHA, 2004; UYTTENDAELE, 2004).

A ocorrência de *Aeromonas* sp. em água pode ser explicada, ainda, pela possibilidade da formação de biofilmes em mangueiras e nas caixas d'água. Boari et al. (2009), estudaram a formação de biofilmes por *Aeromonas hydrophila* em superfícies de aço inox e verificaram que ela ocorre tanto a 4 e 7°C quanto 18°C, sendo as maiores contagens obtidas nesta última temperatura após 10 dias de exposição ($2,2 \times 10^{10}$ UFC.cm⁻²).

A cloração da água, ozonização e aplicação da radiação ultravioleta são inicialmente efetivas para a eliminação de *Aeromonas* spp., entretanto, é necessário que ocorra a aplicação constante destes tratamentos em sistema de distribuição de água para evitar o desenvolvimento destes micro-organismos (JJEMBA et al., 2010).

5.1.2. Ocorrência de *Aeromonas* sp. em vegetais do município de Capão Bonito-SP

Dos vegetais de cultivo convencional, hidropônico e orgânico produzidos em 10 propriedades rurais da cidade de Capão Bonito foi possível isolar *Aeromonas* sp. de 35,1% (26/74) deles. A frequência destes micro-organismos nos três tipos de cultivo, bem como a variação das contagens e suas médias são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13. Ocorrência de *Aeromonas* sp. em vegetais coletados no município de Capão Bonito-SP

Tipo de cultivo	N	Nº de Amostras positivas (%)	Contagens (UFC.g ⁻¹)	
			Variação	Média
Convencional	26	6 (23,0)	<10 ² a 4,6 x 10 ⁴	7,9 x 10 ³
Hidropônico	24	9 (37,5)	<10 ² a 4,8 x 10 ⁴	6,8 x 10 ³
Orgânico	24	11 (45,8)	<10 ² a 4,0 x 10 ⁴	6,4 x 10 ³

n = quantidade de amostras analisadas

Os vegetais obtidos por cultivo orgânico e hidropônico apresentaram maior ocorrência de *Aeromonas* sp. em relação aos convencionais. Entretanto, o tratamento dos dados da ocorrência de *Aeromonas* sp. pelo teste qualitativo resultou em $X^2 = 2,92$ e $p = 0,2319$. Sendo X^2 crítico de 5,99, o teste demonstrou que não há diferença significativa entre a ocorrência de *Aeromonas* sp. nas amostras obtidas pelos três tipos de cultivo a nível de 5% de significância.

Dados da literatura demonstram a frequente ocorrência de *Aeromonas* spp. em diversos tipos de vegetais. Monge, Arias-Echandi e Utzinger (1998) analisaram vegetais em janeiro (mês frio e ventoso), fevereiro e março (quente e ensolarado) em vegetais da Costa Rica e verificaram a presença destes micro-organismos em 30% (4/15) de amostras de coentro, 52% (13/26) de amostras de alface e 46% (10/23) de aipo. O autor observou que não houve alteração na ocorrência destes micro-organismos devido à mudança climática (realizadas de temperaturas menores para as mais elevadas).

Em alfaces cultivadas por hidroponia em Porto Rico, Rivera et al., (2015) verificaram a ocorrência de *Aeromonas* spp. e outros micro-organismos da família *Enterobacteriaceae* em 78% (21/27) dos vegetais analisados obtidos de dois

sistemas de hidroponia e McMahon e Wilson (2001) em 34% dos vegetais orgânicos analisados positivos para estas bactérias.

Da mesma forma, as contagens observadas para os três tipos de cultivo foram próximas e compatíveis com as faixas encontradas na literatura – entre $<10^2$ a 10^5 UFC.g⁻¹ (NEYTS, et al., 2000; LATIF-EUGENIN et al., 2017)

A Tabela 14 apresenta os vegetais positivos para a ocorrência de *Aeromonas* sp. (detectadas por contagem direta ou após enriquecimento seletivo), os tipos de cultivo avaliados e a variação das contagens observadas para cada vegetal analisado no período de coleta.

A quantificação direta de *Aeromonas* sp. foi possível em 19,2% (5/26) das amostras convencionais, 16,6% (4/24) das hidropônicas e 25,0% (6/24) das orgânicas (Tabela 14). Na detecção - etapa de enriquecimento seletivo - *Aeromonas* sp. foram recuperadas de 11,5% (3/26) das amostras convencionais, 25,0% (6/24) das hidropônicas e 20,8% (5/24) das orgânicas.

Tabela 14. Contagens e ocorrência de *Aeromonas* sp. em hortaliças de Capão Bonito-SP no período de dezembro de 2014 a março de 2016 (continua)

Vegetal	Tipo de cultivo	Nº de amostras	Nº de amostras com detecção direta $\geq 10^2$ UFC.g ⁻¹ (%)	Varição da contagem (UFC.g ⁻¹)	Número de amostras positivas após enriquecimento seletivo (%)
Abobrinha	C	Nc			
	H	Nc			
	O	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
Acelga	C	Nc			
	H	Nc			
	O	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
Agrião	C	Nc			
	H	1	0 (0)	$< 10^2$	1 (100)
	O	Nc			
Alecrim	C	1	0 (0)	$< 10^2$	1 (100)
	H	Nc			
	O	Nc			
Alface	C	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	H	6	1 (16,7)	$< 10^2$ a $4,8 \times 10^4$	0 (0)
	O	4	1 (25)	$< 10^2$ a $4,0 \times 10^3$	1 (25)
Almeirão	C	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	H	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	O	3	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
Batata Doce	C	Nc			
	H	Nc			
	O	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
Beterraba	C	1	1 (100)	$2,4 \times 10^2$	0 (0)
	H	1	1 (100)	$3,3 \times 10^4$	0 (0)
	O	2	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
Brunela	C	Nc			
	H	1	0 (0)	$< 10^2$	1 (100)
	O	Nc			
Catalônia	C	Nc			
	H	1	0 (0)	$< 10^2$	1 (100)
	O	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)

Tabela 14. Contagens e ocorrência de *Aeromonas* sp. em hortaliças de Capão Bonito-SP no período de dezembro de 2014 a março de 2016 (continua)

Cenoura	C	Nc			
	H	Nc			
	O	2	0 (0)	$< 10^2$	2 (100)
Cebolinha	C	4	1 (25)	$< 10^2$ a $3,0 \times 10^2$	1 (25)
	H	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	O	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
Chicória	C	Nc			
	H	1	0	$< 10^2$	0 (0)
	O	Nc			
Couve	C	4	1 (25)	$< 10^2$ a $1,3 \times 10^3$	1 (25)
	H	1	0	$< 10^2$	0 (0)
	O	3	1 (100)	$4,0 \times 10^4$	2 (66,7)
Couve flor	C	Nc			
	H	Nc			
	O	1	1 (100)	$2,0 \times 10^2$	0 (0)
Escarola	C	Nc			
	H	1	0	$< 10^2$	0 (0)
	O	1	1 (100)	$2,0 \times 10^3$	0 (0)
Espinafre	C	Nc			
	H	1	1 (100)	$3,6 \times 10^4$	0 (0)
	O	1	1 (100)	$1,9 \times 10^4$	0 (0)
Feijão de corda (vagem)	C	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	H	Nc			
	O	Nc			
Folha de abóbora	C	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	H	Nc			
	O	Nc			
Hortelã	C	1	1 (100)	$4,6 \times 10^3$	0 (0)
	H	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	O	Nc			
Mandioca	C	Nc			
	H	Nc			
	O	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)

Tabela 14. Contagens e ocorrência de *Aeromonas* sp. em hortaliças de Capão Bonito-SP no período de dezembro de 2014 a março de 2016 (continuação)

Manjerição	C	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	H	1	0 (0)	$< 10^2$	1 (100)
	O	Nc			
Manjerona	C	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	H	Nc			
	O	Nc			
Mostarda	C	Nc			
	H	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	O	Nc			
Orégano	C	Nc			
	H	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	O	Nc			
Pimenta Cambuci	C	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	H	Nc			
	O	Nc			
Pimentão	C	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	H	Nc			
	O	Nc			
Repolho	C	4	1 (25)	$< 10^2$ a $9,0 \times 10^2$	0 (0)
	H	Nc			
	O	Nc			
Rúcula	C	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	H	1	1 (100)	$5,8 \times 10^4$	1 (100)
	O	Nc			
Salsinha	C	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	H	1	0 (0)	$< 10^2$	1 (100)
	O	1	1 (100)	$3,6 \times 10^3$	0 (0)
Tomate	C	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	H	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	O	Nc			
Tomilho	C	Nc			
	H	1	0 (0)	$< 10^2$	0 (0)
	O	Nc			

n: número de amostra; Nc: não coletado; C: convencional; H: hidropônico; O: orgânico.

Apesar do enriquecimento seletivo, não foi possível recuperar *Aeromonas* sp. em todas as amostras nas quais foram obtidas contagens ($>10^2$ UFC.g⁻¹). Uma possível causa é o favorecimento de micro-organismos de outros gêneros também resistentes à ampicilina, com melhor capacidade de competição que *Aeromonas* sp., como algumas espécies de *Vibrio cholerae* e micro-organismos da família *Enterobacteriaceae*, ambas produtoras de β -lactamases (HOFER et al., 1999, DRAWS; BONOMO, 2010).

Este trabalho aponta a possibilidade da contaminação de alguns vegetais por água utilizada para irrigação contaminadas por *Aeromonas* sp. Na Tabela 15 são apresentados vegetais de diferentes propriedades contaminados por *Aeromonas* sp., de onde também foram coletadas amostras de água contaminadas por micro-organismos deste gênero.

Estudos demonstram que *Aeromonas* spp. podem contaminar os vegetais pelo contato direto com a água, durante o transporte e o tempo de exposição nas gôndolas de centros de distribuição. Dentre estas, a maior chance de contaminação por *Aeromonas* spp. ocorre na etapa do cultivo, uma vez que as hortaliças estão em contato direto com a água por conta da irrigação (CALLISTER; AGGER, 1987, MARTINELLI, 2010).

Entretanto, não é possível afirmar que os isolados de *Aeromonas* sp. presentes nos vegetais foram provenientes da água utilizada para sua irrigação. Esta correlação só é possível através de técnicas moleculares para verificação da subtipagem dos isolados, como o sequenciamento do DNA.

Tabela 15. Correlação entre amostras contaminadas de água e a frequência de *Aeromonas* sp. em vegetais coletados em Capão Bonito-SP

Propriedade agrícola	Amostra(s) de água positiva para <i>Aeromonas</i> sp.	Amostras de vegetais positivas para <i>Aeromonas</i> sp.	Número de amostras de vegetais coletadas na propriedade	Número de amostras de vegetais positivas para <i>Aeromonas</i> (%)
1	A1, A2 e A3	Beterraba (P1); Couve (P3)	5	2 (40)
2	A4	Couve (P7); Cebolinha (P8)	4	2 (50)
3	A5	Não foi verificada a ocorrência de vegetais contaminados por <i>Aeromonas</i> sp.	1	0
4	A6 e A7	Couve (P12 e P14); Cenoura (P13); Alface lisa (P15); Salsinha (P17)	7	3 (42,8)
9	A12, A15 e A16	Rúcula (P50), Agrião (P51); Brunela (P52); Catalônia (P61); Alface (P62); Salsinha (P63); Manjerição (P65); Beterraba (P67); Espinafre (P69) e Alface (P72)	24	9 (37,5)
10	A18	Não foi verificada a ocorrência de vegetais contaminados por <i>Aeromonas</i> sp.	2	0

n: número de amostras A: água; PR: produtor; Pn: número do vegetal

5.2 Ocorrência de *Aeromonas* sp. em vegetais da cidade de Campinas-SP

Foram analisadas 103 amostras de vegetais cultivados convencionalmente (n=58), por hidroponia (n=15) e também minimamente processadas (prontas para consumo) (n=30) de diversos supermercados de Campinas no período de abril a dezembro de 2015 para verificação da ocorrência de *Aeromonas* sp.

Aeromonas sp. estiveram presentes em 53,4% (55/103) das amostras analisadas. A frequência relativa da ocorrência destes micro-organismos nos três tipos de cultivo e as variações e médias das contagens obtidas são apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16. Ocorrência de *Aeromonas* sp. em vegetais folhosos comercializados em Campinas-SP

Grupos de vegetais analisados	N	Frequência de ocorrência (%)	Contagens (UFC.g ⁻¹)	
			Variação	Média
Convencional	58	33 (56,9)	<10 ² a 3,4 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁵
Hidropônica	15	5 (33,3)	<10 ² a 2,8 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁵
Minimamente processada	30	17 (56,7)	<10 ² a 1,3 x 10 ⁵	7,6 x 10 ³

n = número dos tipos de amostras analisadas

As maiores frequências de ocorrência de *Aeromonas* sp. foram para as hortaliças convencionais e minimamente processadas, com 56,9% e 56,7%, respectivamente. As hortaliças cultivadas por hidroponia apresentaram menor ocorrência destes micro-organismos (33,3%). A maior contagem, 3,4x10⁶ UFC.g⁻¹, foi obtida para espinafre cultivado convencionalmente, seguida de rúcula hidropônica (2,8 x 10⁶ UFC.g⁻¹).

Entretanto, o tratamento dos dados para comparação da ocorrência de *Aeromonas* sp. nos três grupos analisados pelo teste X² qualitativo resultou em X²= 2,84 e p= 0,24. Sendo X² crítico de 5,99, o teste demonstrou que não há diferença significativa entre a ocorrência de *Aeromonas* sp. nos tipos de cultivo ao nível de 5% de significância.

Na Tabela 17 são apresentadas a detecção de *Aeromonas* sp. pelo método direto (contagem), a variação das contagens mínima e máxima observadas

e a ocorrência destes micro-organismos após enriquecimento seletivo (etapa de detecção) nos dez tipos de vegetais analisados. A faixa de contagem dentre todos os vegetais e grupos analisados variou de $<10^2$ a $3,4 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ (esta última para espinafre de cultivo convencional).

Nesta mesma linha de pesquisa, Ginestrea et al. (2005) evidenciaram a alta ocorrência de *Aeromonas* spp. em vegetais comercializados no mercado popular de Maracaibo, na Venezuela. Das 150 amostras analisadas, os autores identificaram micro-organismos do gênero *Aeromonas* em 72,97% delas, com presença de cepas de *A. caviae* e *A. hydrophila*.

Callister e Agger (1987) verificaram uma variação da contagem de *Aeromonas* spp. de $1,0 \times 10^2$ a $2,3 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ para vegetais de cultivo convencional provenientes de estabelecimentos comerciais dos Estados Unidos. Verificaram também que estes números podem aumentar em até mil vezes num tempo de 14 dias de exposição das hortaliças à temperatura de 4°C.

As elevadas contagens obtidas a partir de alguns vegetais, junto ao tempo de armazenamento caracterizam uma ameaça à saúde pública (principalmente em indivíduos com idade inferior a 7 e superior a 60 anos) devido ao fato dos vegetais serem consumidos normalmente crus e haver relatos na literatura de casos de infecção por espécies de *Aeromonas* com contagens iguais ou maiores que 10^6 UFC.g⁻¹ (AGGER; MCCORMICK; GURWITH, 1985, MORGAN et al., 1985, KROVACECK et al., 1995, XANTHOPOULOS, et al. 2010; CANADA, 2012).

Neyts et al. (2000) encontraram contagens de *Aeromonas* spp. abaixo das verificadas neste trabalho em vegetais obtidos de supermercados do comércio local de Flanders, na Bélgica. Os autores detectaram *Aeromonas* mesofílicas em 26% (6/27) das amostras de funcho e azedinha analisadas obtidas por cultivo convencional e contagens variando de $2,9 \times 10^2$ a $4,9 \times 10^3$ UFC.g⁻¹.

Tabela 17. Alguns tipos de hortaliças analisados e seus respectivos cultivos e contagens e médias obtidas no período de abril a dezembro de 2015

Vegetais	Classes dos vegetais analisados	n	Número de amostras com contagens $\geq 10^2$ UFC.g ⁻¹ (%)	Variação da contagem	Número de amostras positivas na detecção (%)
Agrião	C	4	0 (0)	$<10^2$	2 (50)
	H	nr			
	MP	4	1 (25)	$<10^2$ a $6,2 \times 10^3$	0 (0)
Alface crespa	C	13	6 (46,15)	$<10^2$ a $8,8 \times 10^5$	9 (69,2)
	H	6	2 (33,3)	$<10^2$ a $3,6 \times 10^5$	1 (16,7)
	MP	5	0 (0)	$<10^2$ a $1,4 \times 10^4$	1 (20)
Alho poró	C	6	1 (16,7)	$<10^2$ a $3,0 \times 10^4$	2 (33,3)
	H	nr			
	MP	nr			
Almeirão	C	5	2 (40)	$<10^2$ a $9,3 \times 10^4$	4 (80)
	H	nr			
	MP	5	0 (0)	$<10^2$	1 (20)
Cheiro verde	C	5	2 (40)	$<10^2$ a $6,4 \times 10^5$	3 (60)
	H	2	0 (0)	$<10^2$	1 (20)
	MP	5	0 (0)	$<10^2$	1 (20)
Couve	C	5	0 (0)	$<10^2$	2 (40)
	H	1	0 (0)	$<10^2$	1 (100)
	MP	5	1 (20)	$<10^2$ a $1,3 \times 10^5$	2 (40)
Escarola	C	5	1 (20)	$<10^2$ a $2,0 \times 10^4$	2 (40)
	H	nr			
	MP	nr			
Espinafre	C	5	2 (40)	$<10^2$ a $3,4 \times 10^6$	2 (40)
	H	nr			
	MP	nr			
Manjerição	C	5	0 (0)	$<10^2$	1 (20)
	H	nr			
	MP	nr			
Rúcula	C	5	2 (40)	$<10^2$ a $7,5 \times 10^5$	2 (40)
	H	6	1 (16,7)	$<10^2$ a $2,8 \times 10^6$	1 (16,7)
	MP	6	3 (50)	$<10^2$ a $1,9 \times 10^4$	4 (66,7)

n: número de amostras; nr: não realizado; C: convencional; H: hidropônico; MP: minimamente processadas

Por sua vez, Villari et al. (2000), verificaram a ocorrência de *Aeromonas* spp. em alface (45%), endívia (40%) e rúcula (20%) minimamente processadas adquiridas do comércio local em Naples, na Itália. A espécie *A. hydrophila* e *A. caviae* foram predominantes nos vegetais analisados.

Os diferentes números observados neste trabalho e em diversos artigos disponíveis na literatura, tanto para ocorrência quanto para contagens de *Aeromonas* spp. podem ser explicados pelos diferentes períodos de coleta nos quais a amostra foi coletada, localização geográfica, a origem das amostras (tipos de cultivo) e a metodologia analítica empregada pelos autores. Desta forma, os dados confirmam a ubiquidade do gênero e revelam variação do nível de contaminação (NEYTS et al. 2000).

Em relação às contagens de *Aeromonas* spp. observadas nos vegetais minimamente processados, são encontradas na literatura variações entre $<10^2$ a $1,3 \times 10^5$ UFC.g⁻¹. O nível de contaminação por estes micro-organismos no momento do consumo depende da contaminação inicial e propriedades do vegetal, do tipo do processo, da embalagem e das possibilidades do micro-organismo de se multiplicar durante o armazenamento (NEYTS et al., 2000).

De acordo com Nascimento et al., (2003), os vegetais em condições de consumo podem apresentar contagens elevadas de *Aeromonas* sp. pelo contato com o solo e outras fontes naturais e que, devido às condições intrínsecas dos vegetais, pouco pode ser feito para redução da carga inicial destes micro-organismos no campo.

Embora alguns autores tenham verificado que tanto o processo de cloração quanto a atmosfera modificada não tenham sido suficientes para cessar ou diminuir as contagens de *Aeromonas* spp. (AGGER; MCCORMICK; GURWITH, 1985, BERRANG; BRACKETT; BEUCHAT, 1989), Jjemba et al. (2010) sugerem que a cloração aliada à aplicação da radiação ultravioleta podem ser eficientes para diminuição das contagens e mesmo sua eliminação se aplicados constantemente no produto.

Infere-se do exposto por Jjemba et al. (2010), que uma das soluções para a minimizar as contagens de *Aeromonas* sp. em vegetais minimamente processados é a diminuição da vida de prateleira de vegetais minimamente processados entre sua produção e comercialização nas gôndolas a baixas temperaturas.

Além disso, uma possível forma de tratamento para eliminação de *Aeromonas* sp. em vegetais minimamente processados é o uso ácido láctico na concentração de 2% com exposição do vegetal a esta solução por um minuto (UYTTENDAELE et al., 2004).

5.3 Vegetais e sazonalidade

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, quanto maiores as temperaturas observadas no período de coleta, maiores as contagens para *Aeromonas* sp. em vegetais. A Tabela 18 reúne o número de amostras positivas para *Aeromonas* sp., além da variação e médias das contagens destes micro-organismos nos vegetais coletados de ambas as cidades.

Tabela 18. Ocorrência de *Aeromonas* sp. em vegetais coletados em Capão Bonito-SP e Campinas-SP

Período de coleta (meses)	N	Número de amostras positivas (%)	Contagens (UFC.g ⁻¹)	
			Variação	Média
Dezembro e março	65	15 (23,1)	<10 ² a 1,9 x 10 ⁶	3,7 x 10 ⁵
Julho	89	40 (44,9)	<10 ² a 9,3 x 10 ⁴	5,3 x 10 ⁴

n = quantidade dos tipos de amostras analisadas

Conforme esperado, são observadas maiores contagens destes micro-organismos nos meses mais quentes (dezembro e março), cujas temperaturas médias variaram entre 20,6 e 24,9°C (Tabela 19). Observa-se na Tabela 18 que nos meses mais quentes do ano, as contagens atingiram 1,9 x 10⁶ UFC.g⁻¹ e médias de 3,7 x 10⁵ UFC.g⁻¹.

Em contrapartida, no mês de julho (com temperaturas médias variando entre 14,5 e 19,3°C) obteve-se maior ocorrência de *Aeromonas* sp., contagens menores (<10² até 9,3 x 10⁴ UFC.g⁻¹) e médias de 5,3 x 10⁴ UFC.g⁻¹, dados que se apresentam contrários aos esperados.

O tratamento dos dados para comparação da ocorrência de *Aeromonas* sp. nos vegetais nos meses mais quentes e frios pelo teste X^2 qualitativo resultou em $X^2 = 74,95$ e $p = 4,83 \times 10^{-18}$. Sendo X^2 crítico de 3,84, o teste demonstrou que há diferença significativa entre a ocorrência de *Aeromonas* sp. nos meses estudados ao nível de 5% de significância.

Tabela 19. Monitoramento climatológico da cidade de Capão Bonito-SP e Campinas-SP no período da aquisição das hortaliças

Local de Coleta	Data de coleta das amostras	Período de coleta dos dados pelo CIIAGRO	Média das temperaturas máximas	Média das temperaturas mínimas	Temperatura média
Capão Bonito-SP	05/12/2014	04 a 07/12/2014	24,1	17,1	20,6
	12/12/2014	11 a 14/12/2014	27,2	17,5	22,3
	28/03/2015	26 a 29/03/2015	27,8	17,6	22,7
	02/07/2015	02 a 05/07/2015	18,0	12,9	15,5
	15/07/2015	13 a 15/07/2015	25,5	13,1	19,3
	28/03/2016	28 a 30/03/2016	29,1	17,4	23,2
Campinas-SP	02/07/2015	02 a 05/07/2015	20,9	14,8	17,8
	19/07/2015	16 a 19/07/2015	26,5	14,9	20,7
	10/12/2015	10 a 13/12/2015	29,3	20,5	24,9

Algumas possíveis explicações podem ser atribuídas para a maior ocorrência de *Aeromonas* sp. no inverno. Uma delas deve-se ao fato de as temperaturas máximas observadas atingirem valores em torno dos 25°C em alguns períodos do dia (Tabela 19), próximas às ótimas para desenvolvimento de *Aeromonas* sp., que é de 28°C.

Além disso, algumas espécies de *Aeromonas* tem caráter psicrotrófico, adaptando-se bem em temperaturas mais baixas. Também influenciam na ocorrência as diferentes localizações geográficas, tipos de cultivo e metodologia analítica empregada para detecção do gênero. Outra possível explicação é o maior número de amostras coletadas no inverno, propiciando maior probabilidade de detecção de *Aeromonas* sp. nos vegetais

Além do aumento das contagens de *Aeromonas* sp. em vegetais, a sazonalidade tem correlação direta com isolados clínicos, sugerindo que algumas espécies, especialmente *Aeromonas hydrophila*, podem colocar em risco grupos de

imunocomprometidos com maior intensidade nas estações mais quentes (NEYS et al. 2001, BORCHARDT; STEMPER; STANDRIDGE, 2003).

5.4 Perfil de virulência das estirpes de *Aeromonas* sp.

A pesquisa dos genes *act*, *alt* e *ast* codificadores das enterotoxinas Act (citotóxica), Alt (citotônica termolábil) e Ast (citotônica termoestável), respectivamente; *aer*, codificador da aerolisina; e *hlyA* codificador da hemolisina HlyA foi realizada para os 121 isolados. Apenas os genes *act* e *ast* foram detectados através de multiplex PCR. A Figura 6 demonstra a detecção dos 5 genes supracitados para diferentes isolados.

O perfil genotípico de virulência dos isolados apresentou-se bastante variável e revelou que 70,2% (85/121) deles apresentaram-se positivos para a ocorrência do gene *alt* (este de maior prevalência entre os isolados), 32,2% (39/121) para *act*, 53,7% (65/121) para *ast*, 37,2% (45/121) para o gene *hlyA* e 45,5% (55/121) para *aer*. Todos os genes estudados são codificadores de importantes fatores de virulência associados a casos relevantes de diarreias ocasionados por *Aeromonas* spp. (SHA et al., 2002).

As amostras de água de irrigação analisadas apresentaram ocorrência de 76,9% (10/13) das amostras positivas para *alt*, 15,4% (2/13) para *act*, 46,1% (6/13) para *ast*, 30,7% (4/13) para o gene *hlyA* e 45,5% (5/13) para *aer*. A variação da ocorrência destes genes dentre os isolados está apresentada na Tabela 20 e ilustrada na Figura 7.

A partir das combinações de genes de virulência apresentadas na Tabela 20, apenas 7,7% (1/13) dos isolados carregavam os cinco genes de virulência e, em contrapartida, 15,4% (2/13) dos isolados não apresentaram nenhum deles. Também é possível verificar que 61,5% (8/13) das cepas estudadas são β -hemolíticas. Este caráter fenotípico foi verificado em isolados com ocorrência isolada ou concomitante dos genes *act*, *hlyA* e *aer*.

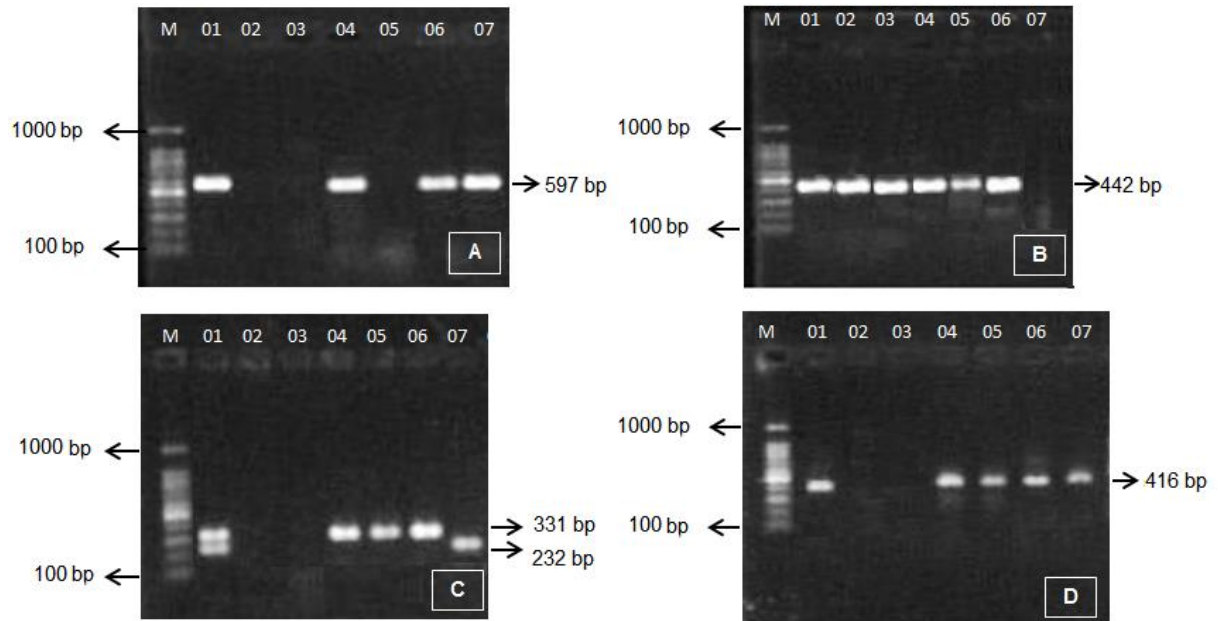


Figura 6 – Géis de agarose após corrida de eletroforese para identificação dos genes de virulência.

- A) **Expressão do gene *hlyA* (597 bp):** M) Marcador 100 bp; 01) *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966; 02) Controle Negativo; 03) A1 - Água de poço artesiano; 04) A2 - A1 armazenada em caixa plástica 05) A3 - A1 armazenada em caixa plástica; 06) P1 - Beterraba de cultivo convencional 07) P7 - Couve de cultivo convencional;
- B) **Expressão do gene *alt* (442 bp):** M) Marcador 100 bp; 01) *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966; 02) C1 - Alface hidropônico; 03) C4 - Almeirão convencional; 04) C5 – Alface crespa convencional; 05) C6 - Cheiro verde convencional; 06) C12.1 - Cheiro verde higienizado; 07) Controle Negativo.
- C) **Expressão do gene *act* (232 bp) e *ast* (331 bp):** M) Marcador 100 bp; 01) *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 (positivo para *act* e *ast*); 02) Controle Negativo; 03) C18.3- Rúcula convencional (negativo para *act* para e *ast*); 04) C18.1- Rúcula convencional (positivo apenas para *ast*); 05) C21 - Alface convencional (positivo apenas para *ast*); 06) C23- Couve convencional (positivo apenas para *ast*); 07) C25- Rúcula higienizada(positivo apenas para *act*);
- D) **Expressão do gene *aer* (416bp):** 01) *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966; 02) Controle Negativo 03) A2.1- água em caixa plástica; 04) A4- água de poço artesiano; 05) A7- Água da torneira de abastecimento público; 06) A15- Reservatório de solução nutritiva; 07) A16- Reservatório de armazenamento e distribuição da água

Tabela 20. Caracterização genotípica e fenotípica dos isolados de *Aeromonas* sp. de amostras de água de irrigação e de Capão Bonito-SP

Codificação produto	Genotípico					Fenotípico
	<i>alt</i>	<i>act</i>	<i>ast</i>	<i>hlyA</i>	<i>aer</i>	β -hemolisina
A1 : A7	P	N	P	N	P	P
A2.1 : A 2.2	P	N	P	P	N	P
A3 : A5: A18	P	N	N	N	N	N
A4	P	N	N	N	P	P
A6 : A8	N	N	N	N	N	N
A12	N	N	P	P	N	P
A15	P	P	N	N	P	P
A16	P	P	P	P	P	P

P: positivo; N: negativo

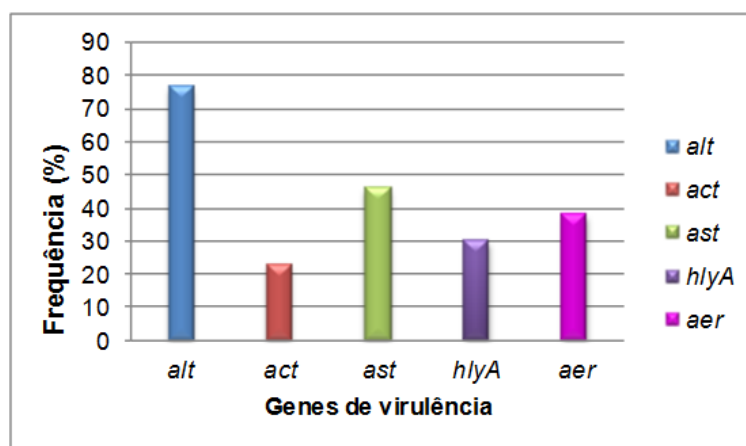


Figura 7. Frequência dos genes de virulência em isolados de *Aeromonas* sp. em água de irrigação de Capão Bonito-SP

A exemplo do verificado para água de irrigação, os isolados obtidos de amostras de vegetais coletadas em Capão Bonito, apresentaram maior ocorrência do gene *alt* em 75,8% (22/29) deles, seguido de *ast*, *aer*, *act* e *hlyA* nas frequências de 48,3% (14/29), 37,9% (11/29), 31,0% (9/29) e 27,5% (8/29) nos isolados vegetais de Capão Bonito, respectivamente. A variação da detecção dos genes de virulência e a ilustração de suas frequências são apresentadas na Tabela 21 e Figura 8, respectivamente.

Tabela 21. Caracterização genotípica e fenotípica dos isolados de *Aeromonas* sp. de amostras de vegetais de Capão Bonito-SP

Codificação produto	Genotípico					Fenotípico
	<i>alt</i>	<i>act</i>	<i>ast</i>	<i>hlyA</i>	<i>aer</i>	β -hemolisina
P1	P	N	N	P	N	P
P3 : P15 : P22 : P31 : P32.3 : P43 : P65	N	N	N	N	N	N
P14 : P61	P	N	N	N	N	N
P7 : P12 : P33 : P42 : P63	P	N	P	P	N	P
P8 : P51	P	P	N	N	P	P
P13 : P44	P	P	P	N	P	P
P17 : P32.2 : P34 : P50	P	N	P	N	P	P
P32.1 : P67	P	P	P	P	P	P
P50.1	P	P	P	N	N	P
P62	P	N	N	N	P	P
P69	P	P	N	N	N	P
P72	P	P	N	P	N	P

P: positivo; N: negativo

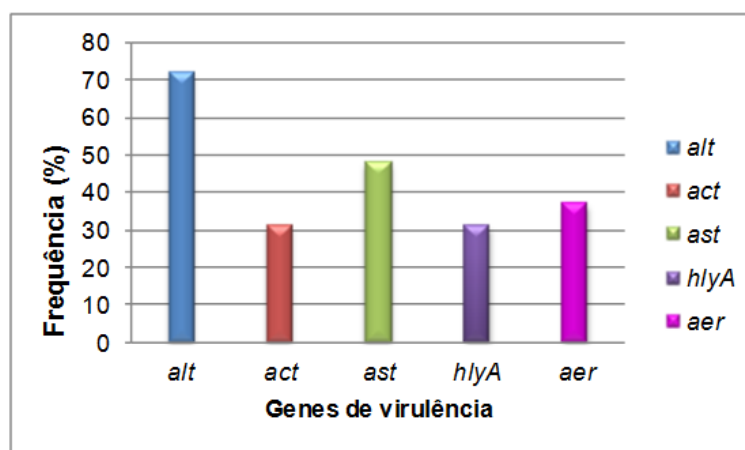


Figura 8. Frequência dos genes de virulência em isolados de *Aeromonas* sp. em vegetais de Capão Bonito-SP

Observa-se na Tabela 21 variação nas combinações de genes de virulência. Apenas 6,9% (2/29) dos isolados carregavam os cinco genes de virulência, enquanto que 24,1% (7/29) não apresentaram nenhum deles. Verifica-se que 68,9% (20/29) dos isolados estudados são β -hemolíticas e que, a exemplo da água, este caráter fenotípico pode ser verificado nos isolados carreadores dos genes *act*, *hlyA* e *aer*.

Para as amostras de vegetais adquiridas do comércio de Campinas-SP, com exceção do gene *alt*, pode-se observar maior expressão de todos os outros genes de virulência estudados. O gene *alt* foi detectado em 68,3% (54/79) dos isolados, seguido de *ast*, *aer*, *hlyA* e *act*, com porcentagens de 56,9% (45/79), 49,4% (39/79), 40,5% (32/79) e 34,2% (27/79), respectivamente (Figura 9). A variação da ocorrência dos genes de virulência está apresentada na Tabela 22.

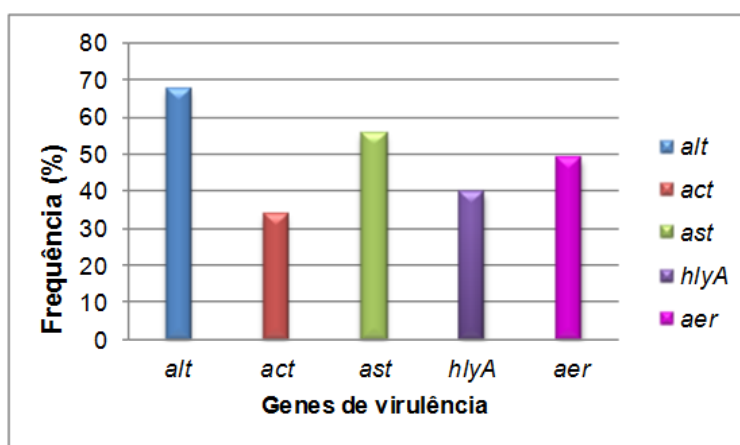


Figura 9. Frequência dos genes de virulência em isolados de *Aeromonas* sp. em vegetais de Campinas-SP

Tabela 22. Caracterização genotípica e fenotípica dos isolados de *Aeromonas sp.* em amostras de vegetais de Campinas-SP

Codificação produto	Genotípico					Fenotípico
	<i>Alt</i>	<i>Act</i>	<i>Ast</i>	<i>hlyA</i>	<i>aer</i>	β-hemolisina
C1 : C29 : C35.1 : C69.1 : C85	P	P	P	P	N	P
C2 : C11 : C28.3 : C31.1 : C31.2	N	P	N	N	P	P
C4 : C42.1 : C62 : C77 : C103	P	P	P	N	P	P
C5 : C17 : C18.1 : C21 : C23 : C31.3 : C64 : C80	P	N	P	N	P	P
C6 : C66 : C82.1 : C84.2	P	N	P	P	P	P
C12.1	P	P	P	N	N	P
C12.2 : C25 : C86.4	P	P	N	N	P	P
C18.2 : C72	P	N	N	N	P	P
C18.3	P	N	N	P	P	P
C27 : C28.2 : C32 : C49 : C54 : C61 : C71.3 : C75 : C82.2 : C95 : C97.1	P	N	P	P	N	P
C28.1 : C99	P	N	N	P	N	P
C35.2 : C43.2 : C46.1 : C47.2 : C50.1 : C50.2 : C57 : C65 : C69.2 : C73	N	N	N	N	N	N
C37.1 : C37.2 : C41 : C42.2 : C43.1 : C81.2	P	N	N	N	N	N
C45 : C47.1 : C71.2	N	P	P	N	P	P
C46.2	P	P	N	P	P	P
C81.1	P	P	N	P	N	P
C48 : C71.1 : C97.2	N	N	N	P	N	P
C70.1	N	N	P	P	P	P
C70.2 : C86.3 : C86.1	N	N	P	N	P	P
C63 : C74 : C86.2	P	P	P	P	P	P
C84.1	P	N	P	N	N	N

P: positivo; N: negativo

Apenas 3,8% (3/79) dos isolados carregavam os cinco genes de virulência, enquanto que 12,7% (10/79) não apresentaram nenhum deles (Tabela 22). Verifica-se que 78,5% (62/79) das cepas estudadas são β-hemolíticas e que, a exemplo do

observado para os isolados de Capão Bonito, este caráter fenotípico é observado em isolados carreadores dos genes *act*, *hlyA* e *aer*.

Houve maior prevalência dos genes *alt* (enterotoxina citotônica termolábil) e *ast* (enterotoxina citotônica termoestável) nos grupos analisados. Estes genes são responsáveis por causar degeneração das criptas e vilosidades do intestino delgado, com intensa secreção de líquidos. Sha, Kozlova e Chopra (2002) verificaram que mutações no gene *alt* ou *ast* de *A. hydrophila* e a subsequente exposição de ratos a esta cepa mutante gerou uma redução significativa do acúmulo de seus fluidos intestinais, reafirmando estes fatores de virulência como causadores de diarreia (JAMES, 2005).

A enterotoxina Act tem atividade citotóxica, enterotóxica e hemolítica (JAMES, 2005; KHAJANCHI *et al.*, 2010). Kingombe *et al* (1999) associaram o gene *act* de *A. hydrophila* com genes de hemolisina de *Aeromonas* spp. por verificarem regiões conservadas no DNA na expressão destes dois genes. Outras *Aeromonas* spp. possuem atividade hemolítica devido à presença dos genes *hlyA* e *aerA*, sendo possível algumas cepas expressarem ambos os genes (WONG; HEUZENROEDER; FLOWER, 1998; HEUZENROEDER *et al*, 1999).

Os genes de virulência podem agir isoladamente ou em sinergia no estabelecimento de infecções por *Aeromonas* spp. em seres humanos. São citadas pela literatura várias frequências de isolamento dos genes *alt*, *ast*, *act*, *hlyA* e *aer* em *Aeromonas* spp. a partir de seu isolamento de fontes hídricas, alimentícias e fezes. Alcides *et al* (2003) verificaram a ocorrência de 51,5% (20/39) de *Aeromonas* spp. em amostras de salsa e agrião adquiridas em mercados do Rio de Janeiro. As cepas de *A. caviae* foram detectadas com maior frequência, e 48,5% delas apresentaram caráter hemolítico a partir da verificação da atividade hemolítica em eritrócitos de coelho e ovelha.

Igbinosa e Okoh (2013) observaram a presença de *Aeromonas* spp. em amostras de água doce e residuais do rio Kat e da estação de tratamento de águas residuais de Fort Beaufort, na Província do Cabo Oriental, na África do Sul. Na água doce foram detectados isolados com os genes de virulência *aer* (43%), *alt* (33%), *ast* (10%) e *hlyA* (86%) e para águas residuais os genes *alt* (54%), *ast* (29%), *hlyA* (88%).

A atividade hemolítica pela produção de hemólise do tipo β (Figura 10) por isolados de *Aeromonas* sp. foi observada em 37,4% (73/195) das amostras e em 75,2% (91/121) dos isolados para os quais foi realizado o teste da capacidade de produção de β -hemolisinas. As frequências relativas são apresentadas na Tabela 23.

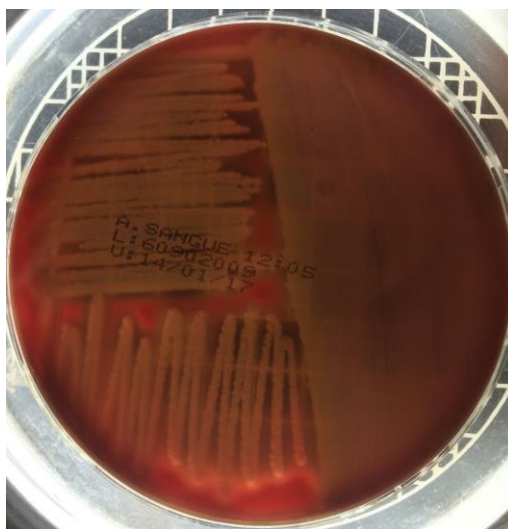


Figura 10. Produção de hemolisina por isolado de *Aeromonas* sp. isolada de rúcula hidropônica (P50) coletada em Capão Bonito-SP

Tabela 23. Distribuição de isolados de *Aeromonas* sp. produtores de β -hemolisina em amostras de água de irrigação e vegetais de Capão Bonito-SP e vegetais de Campinas-SP

Classe	n de isolados positivos para <i>Aeromonas</i> sp.	Número e frequência (%) de isolados produtores de β -hemolisina
Água de Capão Bonito	13	9 (69,2)
Vegetais de Capão Bonito	29	20 (68,9)
Hortaliças de Campinas	79	62 (78,5)

n: número

De acordo com a Tabela 23, há considerável ocorrência de *Aeromonas* sp. β -hemolíticas em todos os grupos analisados, entretanto, há considerável aumento da ocorrência de *Aeromonas* sp. β -hemolíticas nas amostras adquiridas no varejo de Campinas-SP.

Ensaio para a detecção da produção de hemolisinas por *Aeromonas* spp. tem sido descritos por diversos autores. Os resultados indicam que espécies de *Aeromonas* podem expressar um de seus fatores de virulência (β -hemolisina),

representando um risco à saúde do homem. Além disso, a produção de β -hemolisinas pode ocorrer em diferentes temperaturas de crescimento: 37, 28 e 5°C (TSAI; CHEN, 1996).

Também têm sido encontrados resultados com percentuais equivalentes para a produção de β -hemolisina por cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de amostras ambientais e clínicas. Gibotti et al. (2000) isolaram *Aeromonas* spp. da água do rio Cambé (Paraná) que serve para irrigação, recreação e consumo animal e verificaram que 45% das cepas apresentaram atividade hemolítica.

Na Áustria, *Aeromonas* spp. foram isoladas de um sistema de distribuição de água não clorada, sendo 64% delas produtoras de hemolisinas (BURKE et al., 1984). *Aeromonas* spp. isoladas de amostras clínicas também tem demonstrado a capacidade de produção de hemolisinas (GUERRA et al, 2007).

5.5 Suscetibilidade aos antimicrobianos

O perfil de suscetibilidade dos 121 isolados em estudo foi avaliado pelo método de difusão em disco segundo o “Clinical Laboratory Standards Institute” (2003). Para esta análise foram selecionados 7 antibióticos representantes de diferentes classes e com diferentes alvos na célula bacteriana (Tabela 10), comumente utilizados pela medicina humana e animal. A interpretação dos perfis de suscetibilidade foi realizada de acordo com o CLSI M45-A (2006) *apud* Barroco (2013) e CLSI M100-S18 (2008) através da medida dos halos (Figura 11). Os resultados dos perfis avaliados são apresentados na Tabela 24.

Infere-se da Tabela 24 que os antimicrobianos que apresentam maior eficácia contra *Aeromonas* foram: ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina e moxifloxacina, visto que foram eficazes contra todos os isolados testados. Em seguida, tem-se maior sensibilidade de *Aeromonas* aos antimicrobianos cefepime e tetraciclina, com frequências de 3,0% (4/121) e 9,0% (11/121), respectivamente. Apenas 1,6% (2/121) dos isolados foram sensíveis à clindamicina.

Alguns isolados apresentaram resistência intermediária aos antimicrobianos testados, indicando sua ação apenas em alguns sítios do micro-

organismo. Nestes casos, sugere-se a administração de maiores doses dos agentes para tratamento de infecções.

Dentre os isolados testados, não se observou resistência intermediária para cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, ciprofloxacina e moxifloxacina. Entretanto, respostas diferentes foram observadas para cefepime e clindamicina, para os quais observou-se resistência intermediária de 97,0% (117/121) e 1,6% (2/121), respectivamente.

Tabela 24. Frequência da suscetibilidade dos isolados de *Aeromonas* sp. resistentes, com resistência intermediária e sensíveis aos antimicrobianos testados

			Antibióticos testados - frequência de isolados resistentes, com resistência intermediária e sensíveis (%)																					
			CIPROFLOXACINA			CLINDAMICINA			CLORANFENICOL			CEFEPIME			GENTAMICINA			TETRACICLINA			MOXIFLOXACINA			
Origem dos isolados	n		R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	
CB-SP	AI	13	0	0	100	100	0	0	0	0	0	100	7,7	92,3	0	0	0	100	23,1	0	77,0	0	0	100
	C	6	0	0	100	100	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	17,0	0	83,0	0	0	100
	H	10	0	0	100	100	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	30,0	0	70,0	0	0	100
	O	13	0	0	100	92,0	8	0	0	0	0	100	8	92	0	0	0	100	15,0	0	85,0	0	0	100
CPS-SP	C	47	0	0	100	93,7	2,1	4,2	0	0	100	4,2	95,8	0	0	0	100	4,2	0	95,8	0	0	100	
	H	7	0	0	100	100	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0	0	100	0	0	100	
	MP	25	0	0	100	100	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0	0	100	0	0	100	

CB-SP= Capão Bonito-SP : CPS-SP= Campinas-SP

AI= Água de Irrigação : C= Convencional : H= Hidropônico : O= Orgânico : MP= Minimamente Processada : n = número de amostras

R= Resistente : I=Intermediária : S=Sensível



Figura 11. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos de *Aeromonas* sp. isolada de amostra de couve higienizada comercializada em Campinas

A eficácia da ciprofloxacina contra isolados de *Aeromonas* condizem com vários estudos que isolaram estes micro-organismos de diversas fontes (PALU et al., 2006, SCOARIS et al., 2008, AWAN et al., 2009, GUO et al., 2014). As quinolonas, classe a qual pertencem as ciprofloxacinas, inibem a atividade da enzima DNA girase, essencial à atividade da célula bacteriana. Com a inibição enzimática, o DNA ocupa grande espaço dentro da célula e suas extremidades livres acarretam a síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, ocasionando a morte das bactérias (BRASIL, 2016).

A elevada frequência de cepas sensíveis ao cloranfenicol, da classe dos fenicóis, é coincidente com os resultados apresentados por outros autores (GONI-URRIZA et al., 2000, PALU et al., 2006, AWAN et al., 2009). Vila et al., (2003) isolaram *Aeromonas veronii* subespécie *sobria* e *Aeromonas caviae* de amostras clínicas e verificaram resistência variada a cloranfenicol (66,6 e 71,4%, respectivamente).

A resistência aos fenicóis ocorre em bactérias que produzem enzimas acetiltransferases, que agem catalisando a acetilação do grupo 3-hidroxi do cloranfenicol, tornando-o incapaz de se ligar à subunidade ribossomal 50S. A resistência ao cloranfenicol tem sido associada à presença de genes codificadores para enzimas acetiltransferases identificados em elementos móveis de DNA (HENRIQUES et al., 2006; CHANG et al., 2007).

Observou-se neste estudo a eficácia da gentamicina, pertencente à classe dos aminoglicosídeos frente a todos os isolados. Entretanto, diversos estudos apontaram a resistência de *Aeromonas* spp. de diferentes origens a antimicrobianos do grupo dos aminoglicosídeos (KO, et al., 1996, GONI-URRIZA et al., 2000; ALCIDES; GUIMARAES; FERREIRA, 2003, PALU et al., 2006, CERESER et al., 2013).

Os aminoglicosídeos agem em bactérias Gram negativas pela inibição irreversível da síntese proteica através da ligação do princípio ativo com proteínas específicas da subunidade 30S dos ribossomos. Isso acarreta na leitura incorreta do RNAm e gera proteínas tóxicas e não funcionais, além de interromper a tradução ou fazer com que ela termine prematuramente (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

A resistência de *Aeromonas* spp. aos aminoglicosídeos tem sido associada à modificação do mecanismo de ação do antibiótico por ação das enzimas aminoglicosídeo 3'-adeniltransferase e aminoglicosídeo-(6')-N-acetiltransferase codificadas pelos genes *aadA* e *aac(6')-Ib-cr*, respectivamente (HENRIQUES et al., 2006; CHANG et al., 2007).

As fluoroquinolonas são pertencentes ao grupo das quinolonas, com a diferença da inclusão de um átomo de flúor na posição 6 do anel quinolônico (BRASIL, 2016). São eficazes em tratamentos de infecções associadas ao gênero *Aeromonas* (JANDA; ABBOTT, 2010). Neste estudo, todas as cepas foram sensíveis a moxifloxacina, resultados condizentes com o obtido por Ko et al. (1996).

Em relação às cefalosporinas de quarta geração, observou-se no presente estudo que apenas 3,3% (4/121) dos isolados apresentaram perfil de resistência a cefepime e 96,7% (117/121) resistência intermediária. A eficácia de cefepime frente a *Aeromonas* sp. também foi verificada por Martineli (2010) em isolados de abatedouro bovino. Dos 62 isolados, todos foram inibidos por este antimicrobiano. Da mesma forma, Vizzotto (2009) identificou isolados do Estado do Paraná e verificou que dos 74 isolados, todos apresentaram-se sensíveis a cefepime.

Para tetraciclina, a frequência de resistência foi de 9,0% (11/121). Em contrapartida, todos os outros 91% (110/121) foram sensíveis. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por diversos autores que encontraram alta porcentagem de cepas sensíveis a este antimicrobiano em suas pesquisas (GONI-URRIZA, 2000, AWAN et al., 2009, BALSALOBRE, 2014). Entretanto, Palu et al. (2006), apontam em seu estudo elevada resistência de isolados clínicos de *Aeromonas* spp. à tetraciclina.

A existência de cepas resistentes para este antibiótico pode ser relacionada ao fato de que a tetraciclina tem sido bastante usada na clínica humana e animal para tratamento de infecções causadas por bactérias mais resistentes, o que implica na elevada resistência observada em alguns estudos (especialmente clínicos e ambientais). A resistência à tetraciclina é explicada pelo fato de terem sido encontrados genes codificantes de determinantes de resistência às tetraciclinas em *Aeromonas* spp. (BALASSIANO et al., 2007; HENRIQUES et al., 2008).

Quanto à clindamicina, a resistência observada nesta pesquisa (96,7% (117/121)) concorda com os estudos de Yano et al. (2015), que verificaram a presença de 98,0% (85/87) de *Aeromonas* spp. resistentes isoladas de espécies de camarões comercializados na Tailândia. Também, 90,0% (51/57) dos isolados obtidos por Awan et al. (2009) de várias amostras de alimentos coletados em Abu Dabi, nos Emirados Árabes foram resistentes à clindamicina.

Sabe-se que este antibiótico atua na inibição da biossíntese da parede celular, na permeabilidade da membrana e inibição da síntese de RNA. Possíveis alterações no RNA ribossomal podem levar à resistência das cepas às clindamicinas, fato que pode explicar a resistência de *Aeromonas* sp. deste trabalho a este antimicrobiano (MOURA, 2010).

Uma cepa é considerada multirresistente quando apresenta resistência a dois ou mais antibióticos de diferentes classes com alvos diferentes na célula bacteriana (COUTO, 2003). Assim, no presente estudo, cerca de 11,6% (14/121) dos isolados analisados apresentaram resistência a dois (13/121) ou três antibióticos (1/121). O perfil de multirresistência dos isolados é apresentado na Tabela 25.

Os fenótipos de multirresistência entre isolados de água utilizada para irrigação e vegetais estão apresentados na Tabela 25. Verifica-se que todas as cepas são resistentes à clindamicina, seguidas da tetraciclina 78,6% (11/14) e ciprofloxacina 28,6% (4/14).

Tabela 25. Fenótipos de multirresistência observados entre os isolados estudados

Origem	Código e caracterização dos isolados	Fenótipo de resistência
Campinas-SP	(C32) Cheiro verde convencional	CPM - CLI
	(C35) Cheiro verde convencional	TET - CLI
	(C37) Alface crespa convencional	TET - CLI
	(C42) Alface crespa convencional	CPM - CLI
Capão Bonito-SP	(A3) Água armazenada em caixa plástica	TET - CLI
	(A4) Água de poço artesiano	TET - CLI
	(A5) Água de riacho	TET - CLI
	(A6) Água de poço artesiano	CPM - CLI
	(P3) Couve convencional	TET - CLI
	(P14) Couve japonesa orgânica	TET - CLI
	(P34) Couve flor orgânica	TET - CPM- CLI
	(P61) Catalônia hidropônica	TET - CLI
	(P65) Manjerição hidropônico	TET - CLI
	(P72) Alface crespa hidropônica	TET - CLI

CLI – clindamicina; CPM – ciprofloxacina; TET - tetraciclina.

O uso indevido e indiscriminado dos fármacos e de agrotóxicos (que era utilizado ao redor de algumas propriedades por produtores de Capão Bonito-SP) aumenta a probabilidade de seleção de estirpes resistentes a antimicrobianos no ambiente (FUJIMOTO, 2016).

Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos leva a uma possível disseminação de genes de resistência entre diversas populações bacterianas por transferência horizontal (de *Aeromonas* para *Escherichia coli*, por exemplo). Num estudo dinamarquês, três isolados de *Aeromonas salmonicida* transferiram seu plasmídeo de resistência aos antibióticos oxitetraciclina, sulfonamidas, trimetoprim e estreptomicina para a *E. coli* (SORUM, 2006).

6 CONCLUSÃO

Elevada ocorrência de *Aeromonas* spp. em água de irrigação e vegetais obtidos por diferentes tipos de cultivo e minimamente processados foi observada, portanto, os consumidores devem preparar os vegetais de acordo com as Boas práticas de manipulação para minimizar os riscos de infecções.

Foram observadas maiores contagens de *Aeromonas* spp. em amostras vegetais coletadas em supermercados de Campinas (grupos convencional e hidropônica) em relação às coletadas em Capão Bonito (convencional, hidropônica e orgânica), indicando que há multiplicação destes micro-organismos às baixas temperaturas durante a exposição nas gôndolas para comercialização.

A alta ocorrência e contagem média de $7,6 \times 10^3$ UFC/g de *Aeromonas* sp. em vegetais minimamente processados obtidos do comércio de Campinas indica que o processamento mínimo pode reduzir as contagens de *Aeromonas* sp., mas as células remanescentes podem se multiplicar e chegar a elevados níveis (até 10^5 UFC.g⁻¹) durante o armazenamento.

A maioria dos isolados de *Aeromonas* sp. apresenta ao menos um dos genes de virulência estudados nesta pesquisa, o que configura um risco para a saúde pública, principalmente pelo fato de alguns serem carreadores de genes codificadores de enterotoxinas e hemolisinas.

Os isolados de *Aeromonas* sp. apresentaram resistência aos antibióticos comumente utilizados para tratamento de infecções como clindamicina, cefepime e tetraciclina. Isto demonstra a necessidade do uso controlado de antibióticos (principalmente os utilizados ao redor das propriedades rurais) para que não sejam originadas espécies resistentes ou multirresistentes, conforme observado para 11,6% (14/121) dos isolados testados.

Além disso, a resistência adquirida apresentada por alguns isolados é preocupante, uma vez que as culturas foram isoladas de vegetais que são normalmente consumidos crus e que, embora passem pelo processo de cloração, ainda podem carrear micro-organismos do gênero *Aeromonas*, culminando num risco à saúde do consumidor.

7 REFERÊNCIAS

- A. ELMANAMA, A; ARAFA, H. Z; ABU-OWDA, S M. Bacteriological Quality of Fresh Vegetables Salad Sold in Schools Canteens and Restaurants in Gaza Strip- Palestine. **IUG Journal For Natural And Engineering Studies**sp. 1-12. jan. 2017.
- AGGER, W; MCCORMICK, J D; GURWITH, M J. Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila* - associated *diarrhoea*. **Journal Of Clinical Microbiology**. p. 909-913. jun. 1985.
- ALCIDES, A. P.; GUIMARAES, M. S.; FERREIRA, M. C. S. Occurrence of *Aeromonas* in parsley and watercress sold in street-markets of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Quality**. Trumbul, v. 26, p. 75-86. fev. 2003.
- ALCAIDE, E.; BLASCO, M.; ESTEVE, C. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. **Research In Microbiology**. p. 40-45. fev. 2010.
- ALTWEGG, M.; GEISS, H. K. *Aeromonas* as a human pathogen. Critical Reviews In Microbiology. Washington, v.16, n 4, p. 253-286. 1989.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington: APHA, 2012. 676p.
- ARAVENA-ROMÁN, Max et al. Antimicrobial Susceptibilities of *Aeromonas* Strains Isolated from Clinical and Environmental Sources to 26 Antimicrobial Agents. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. p. 1110-1112. fev. 2012.
- ASSOCIACAO BRASILEIRA DO COMERCIO DE SEMESTES E MUDAS (ABCSEM) (Org.). **Cadeia produtiva de hortaliças gira, por ano, R\$ 55 bi no país**. 2016. Disponível em: <<http://www.organicnet.com.br/2016/10/brasil-cadeia-produtiva-de-hortalicas-gira-por-ano-r-55-bilhoes>>. Acesso em: 18 mar. 2017.
- AWAN, M. B. et al. Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* spp. isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates. **New Microbiologica**. p. 17-23. 2009.
- BALASSIANO, I.T. et al. The involvement of tetA and tetE tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. **Instituto Oswaldo Cruz**. 34, p. 861-866. 2007.
- BALSALOBRE, Livia Carminato. **Resistência a tetraciclinas em isolados clínicos e ambientais de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Aeromonas* spp.: identificação e mapeamento do ambiente genético de genes tet**. 2014. 159 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- BARROCO, C. A. B. A. **Antibiorresistência e Pesquisa de Fatores de Virulência em *Aeromonas* spp**. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Aplicada, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

BERRANG, M. E; BRACKETT, R. E; BEUCHAT, L R. Growth of *Aeromonas hydrophila* on fresh vegetables stored under a controlled atmosphere. **Appl Environ Microbiol.** p. 2167-2171. set. 1989.

BOARI, Cleube Andrade et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p.886-895, dez. 2009.

BONILHA, P. R. M.; FALCÃO, D. P. Ocorrência de enteropatógenos em alfaces e suas águas de irrigação. **Alimentação e Nutrição**, Araraquara, n. 5, p.87-97, 1994.

BORA, A. et al. Isolation of *Aeromonas salmonicida* from Human Blood Sample: A Case Report. **International Journal Of Current Microbiology And Applied Sciences.** Jodhpur, p. 57-61. mar. 2016.

BORCHARDT, M. A.; STEMPER, M. E.; STANDRIDGE, J. H.. *Aeromonas* Isolates from Human Diarrheic Stool and Groundwater Compared by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Emerging Infectious Diseases.** X, p. 224-228. fev. 2003.

BRANDAO, A. A et al . Perfil socioeconômico dos consumidores de hortaliças em feiras livres na microrregião de Januária. **Horticultura Brasileira**, Vitoria da Conquista, v.33, n. 1, p. 119-124, Mar. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362015000100119&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 18 Mar. 2017.

BRASIL. ANVISA. . **Antimicrobianos - bases teóricas e uso clínico.** 2016. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/quinolonas2.htm>. Acesso em: 16 out. 2016.

BRASIL. Decreto-Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, 24 dez. 2003. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=8&data=24/12/2003>> Acesso em: 15 fev. 2017

BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (Org.). **Aquisição Alimentar Domiciliar per Capita Brasil e Grandes Regiões:** Brasil - Grandes Regiões. 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/default_zip.shtm>. Acesso em: 04 jan. 2016.

BRASIL. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

BRYANT, P. A.; BABL, F. E.; DALEY, A. J.. *Aeromonas* Associated With Swimming Pool Folliculitis. **The Pediatric Infectious Disease Journal.** Melbourne, p. 118-119. jan. 2016.

- BULHÕES, C. C. C.; ROSSI Jr., O. D. Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo-de-minas frescal artesanal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 3, p. 320-324, 2002.
- BURKE, V. et al. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. **Applied And Environmental Microbiology**. p. 361-366. ago. 1984.
- CALLISTER, S. M.; AGGER, W. A.. Enumeration and Characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* Isolated from Grocery Store Produce. **Applied And Environmental Microbiology**. p. 249-253. fev. 1987.
- CARVALHO, R. D. **Efeito da Alta Pressão Hidrostática em *Aeromonas hydrophila* AH 191 crescida em leite e em meio de cultura**. 2010. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Funcional e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- CASTRO-ESCARPULLI, G. et al. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, v. 22, n. 4, p.206-216, out. 2002.
- CEASA (Brasil). **Mercado de Hortifrutigranjeiros: Completo**. 2017. Disponível em: <http://www.ceasacampinas.com.br/novo/Inst_HortiFrutis.asp>. Acesso em: 18 jul. 2017.
- CHACÓN, M.R. et al. A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. p. 221-225. nov. 2002.
- CHANG, Y.C. et al. Molecular characterization of class 1 integrons and antimicrobial resistance in *Aeromonas* strains from foodborne outbreak-suspect samples and environmental sources in Taiwan. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**. v. 2, n. 59, p. 191-197. 2007.
- CHAURET, C. et al. Detection of *Aeromonas hydrophila* in a drinking-water distribution system: a field and pilot study. **Canadian Journal Of Microbiology**. p. 782-786. ago. 2001.
- CHOPRA, A. K.; HOUSTON, C.W. Enterotoxins in *Aeromonas* – associated gastroenteritis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 1, p. 1129-1137, 1999.
- CIIAGRO (Brasil) (Org.). **CIIAGRO - Dados Mensais no período de 01/12/2014 até 31/12/2015**. Disponível em: <<http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/Quadros/QTmedPeriodo.asp>>. Acesso em: 16 out. 2016.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. CLSI Publication M100-S18, Vol. 28, n 1. Wayne, PA: CLSI; 2008.
- COLWELL, R. R.; MACDONELL, M. T.; LEY, J. de. Proposal to Recognize the Family *Aeromonadaceae* fam. nov. **International Journal Of Systematic Bacteriolo**. College Park, p. 473-477. jul. 1986.

COUTO R. Bacterias Multirresistentes. In: Couto R., Pedrosa T. M.G., Nogueira J. M., editors. **Infecção Hospitalar e Outras Complicações não infecciosas da Doença**. 3 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. p. 557-88.

DRAWS, S. M.; BONOMO, R. A.. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. **Clinical Microbiological Reviews**. p. 160-201. jan. 2010.

EMATER-MG (Org.). **Água para consumo na propriedade rural**. Belo Horizonte: Emater-mg, 2012. 18 p.

[EPA] United States Enviromental Protection Agency, Office of Water. **Method 1605: Aeromonas in finished water by membrane filtration using ampicillin-dextrin agar with vancomycin (ADA-V)**. Washington, 2001.

EPA, Environmental Protection Agency. 2006. *Aeromonas*: human health criteria document. Washington, 2006.

ESCUDEIRO, D. **Caracterização, pesquisa dos genes de virulência β -lactamases em *Aeromonas hydrophila* provenientes de esgoto e lodo tratados**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de São Paulo, 2011.

FAVARO-TRINDADE, C. S. et al. Efeito dos Sistemas de Cultivo Orgânico, Hidropônico e Convencional na Qualidade de Alface Lisa. **Brazilian Journal Of Food Technology**. p. 111-115. jun. 2007.

FENG, Peter; WEAGANT, Stephen D.; JINNEMAN, Karen. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: ESTADOS UNIDOS. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. (Org.). **Bacteriological Analytical Manual: Methods for Specific Pathogens**. 2016. Cap. 4. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>>. Acesso em: 10 out. 2016.

FIGUERAS, M.J. et al. '*Aeromonas intestinalis*' and '*Aeromonas enterica*' isolated from human faeces, '*Aeromonas crassostreae*' from oyster and '*Aeromonas aquatilis*' isolated from lake water represent novel species. **New Microbes New Infections**. p. 4-76. jan. 2017.

FIGUERAS, M. J.; BORREGO, J.J.. New Perspectives in Monitoring Drinking Water Microbial Quality. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**. p. 4179-4202. dez. 2010.

FURLANI, P. R. et al. **Cultivo Hidropônico de Plantas: Parte 1 - Conjunto hidráulico**. 2009. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/Hidroponiap1/Index.htm>. Acesso em: 12 jan. 2016.

FUJIMOTO, G. (Org.). **Monitoramento de padrões de potabilidade de águas de poços artesianos do município de Capão Bonito– SP**. Capão Bonito: Faculdade de Tecnologia - Fatec, 2016. 90 p.

GALINDO, C.L. et al. Host Immune responses to *Aeromonas* virulence factors. **Current Immunology Reviews**. Valbonne, p. 13-26. 2006.

GAVRIEL, A. A.; LANDRE, J.P.; LAMB, J.A. Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland. **Journal Of Applied Microbiology**. p. 383-392. 1998.

GHENGHESH, K. S. et al. *Aeromonas*-associated infections in developing countries. **Immune Diagnostics And Research**. p. 81-98. 2008.

GIBOTTI A. et al., Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non-01, *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambé Stream (State of Paraná, Brazil). **Journal of Applied Microbiology**. n. 89, p.70-75. 2000

GINESTREA, M; et al., Especies de *Aeromonas* en vegetales frescos que se expenden en un mercado popular de Maracaibo. **Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología**, v.25, n.2, p.96-99, 2005.

GONI-URRIZA, M. et al. Antimicrobial resistance og mesophilic *Aeromonas* spp isolated from two European rivers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 46, n. 2, p. 297-301, ago. 2000.

GOMES NETO, N. J. et al. Bacterial counts and the occurrence of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) from different cropping systems in Brazil. **Food Control**. p. 47-51. 2012.

GRAVES, C. J.. The Nutrient Film Technique. **Horticultural Reviews**. p. 1-43. fev. 1983.

GUO, P. et al. Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Outer Membrane Proteins of *Aeromonas hydrophila* Isolated in China. **Journal Of Integrative Agriculture**. p. 911-917. abr. 2014.

GUERRA, I.M. et al. *Aeromonas* associated diarrhoeal diseases in South Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.2, p 638-643, 2007.

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

HEALTH PRODUCTS AND FOOD BRANCH. **MFLP-58B**: Enumeration of *Aeromonas hydrophila* in Ice and Water by the Hydrophobic Grid-Membrane Filter (HGMF) Technique. Ottawa: 2012. 4p.

HENRIQUES I.S. et al. Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. **Research in Microbiology**. v.10, n 157, p. 938 – 947 , 2006.

HENRIQUES, I.S. et al. Tetracycline resistance genes in Gram-negative isolates from estuarine waters. **Letters In Applied Microbiology**. v. 46, n47, p. 526-533. 2008.

HEUZENROEDER, M. W.; WONG, C.Y.F.; FLOWER, R.L.P. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. **FEMS Microbiology Letters** v. 174, p. 131- 136, 1999.

HIRANSUTHIKUL, N. et al. Skin and Soft-Tissue Infections among Tsunami Survivors in Southern Thailand. **Clinical Infectious Diseases**. p. 93-96. out. 2005.

HOFER, E. et al. Emergência da múltipla resistência a antimicrobianos em *Vibrio cholerae* isolados de pacientes com gastroenterite no Ceará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 2, p. 151-156, Abr. 1999. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821999000200006&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 19 Mar. 2017.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821999000200006>.

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

HUDSON, J. A.; AVERY, S. M. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas* and *Yersinia enterocolitica* on cooked muscle tissue under refrigeration and mild temperature abuse. **Journal of Food Safety**, v.14, p. 41-52, 1994.

IBRAHIM, A.; MAC-RAE, I.C.. Incidence of *Aeromonas* and *Listeria* spp. in red meat and milk samples in Brisbane, Australia. **International Journal Of Food Microbiology**, Queensland, v. 12, n. 2-3, p.263-269, fev. 1991. DOI: 10.1016/0168-1605(91)90077-3.

JACXSENS L. et al., Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas* spp. on Fresh-Cut Produce Packaged under Equilibrium-Modified Atmosphere. **Journal Of Food Protection**. p. 1103-1227. out. 1999.

JAMES M.J., (2005). Microbiologia de Alimentos. 6º ed. Artmed

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L.. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p.35-73, jan. 2010.

JENSEN, M. H.; COLLINS, W. L.. The Nutrient Film Technique. **Horticultural Reviews**. v.7, p. 483-558. 1985.

JJEMBA, P.K. et al., Regrowth of potential opportunistic pathogens and algae in reclaimed-water distribution systems. **Applied and Environmental Microbiology**. v.76, n. 7, p. 4169-4178, 2010.

JUNIOR1, O.D.R. et al. Enterotoxigenicidade de cepas de *Aeromonas* sp. isoladas em diferentes pontos do fluxograma de abate bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p.589-594, 2001.

KHAJANCHI B.K., et al. Distribution of Virulence Factors and Molecular RAPD of *Aeromonas* Species Isolates from Water and Clinical Samples: Suggestive Evidence of Water-to-Human Transmission. **Applied and Environmental Microbiology**. v.76, n. 7, p. 2313 – 2325, 2010

KO, W. C. et al. Increasing Antibiotic Resistance in Clinical Isolates of *Aeromonas* Strains in Taiwan. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. p. 1260-1262. maio 1996.

KROVACECK, K. et al. Isolation and virulence profiles of *Aeromonas hydrophila* implicated in outbreak of food poisoning in Sweden. *Microbiology and Immunology* v. 39, n. 9, p. 655-661, 1995.

LATIF-EUGENÍN, F. et al. Chlorinated and ultraviolet radiation-treated reclaimed irrigation water is the source of *Aeromonas* found in vegetables used for human consumption. **Environmental Research**. p. 190-195. jan. 2017.

LOPES, A. C. A. **Enterotoxina citotóxica termo estável produzida por *Aeromonas* isoladas de surto de diarreia aguda em crianças na cidade de São Bento do Una - PE**. 2009. 72 f. Tese (Doutorado) - Curso de Faculdade de Ciências Médicas, Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

MAJEED, K.N.; EGAN, A. F.; MAC RAE, I. C. Production of exotoxin by *Aeromonas* spp. at 5°C. **Journal of Applied Bacteriology**, 69, 332-337, 1990.

MARQUES, C. L. M. **Caracterização molecular de cepas de *Aeromonas* spp. isoladas durante um surto de diarreia em São Bento do Una, PE, 2004**. 72 f. Tese (Doutorado) - Curso de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

MARQUES, C. L.M. Molecular characterization of *Aeromonas* spp. and *Vibrio cholerae* O1 isolated during a diarrhea outbreak. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 54, n. 6, p. 299-304, Dez. 2012 .

MARQUES, C.L.M.; HOFER, E.; LEAL, N. C. Development of duplex-PCR for identification of *Aeromonas* species. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 46, p.355-357, jun. 2013.

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S.W. 2005. Family I. *Aeromonadaceae* Colwell, MacDonell and De Ley 1986, 474VP. In: Brenner, Krieg, Staley and Garrity, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria. 2nd ed. New York: Springer.

MARTINELLI, T. M., et al. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em abatedouro bovino e sensibilidade a antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 195-202, 2010.

MARTINS, A. G. L.A. **Efeito da emissão dos efluentes domésticos na proliferação de *Aeromonas* sp. em águas de superfície e pescado do estuário do Rio Bacanga, São Luís/MA**. 2005. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Marinhas Tropicais, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MCMAHON, M.; WILSON, I.. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. **Int J Food Microbiol**. p. 155-162. out. 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. **International Association For Food Protection**, v.62, n.5, p 463-466, 1999.

MONFORT, P.; BALEUX, B.. Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* in a Sewage Treatment Pond. **Applied And Environmental Microbiology**. p. 1999-2006. mar. 1990

- MONGE, R.; ARIAS-ECHANDI, M.L.; UTZINGER, D. Presence of cytotoxic *Aeromonas* and *Plesiomonas shigelloides* in fresh vegetables. **Revista Biomédica**. v. 9, n. 3, p.176-180, 1998.
- MORGAN, D R et al. Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for humans. **Infection Immunology**, p. 62-65. out. 1985.
- MOURA, E. M. M. **Análise do perfil de resistência a antibióticos e detecção dos genes de virulência e resistência em *Aeromonas* provenientes de amostras ambientais**. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- NAHARRO, G. et al. Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens. Donggyoi Liu, CRC Press, 2011.
- NAGAR, V; SHASHIDHAR, R; BANDEKAR, J. Prevalence, Characterization, and Antimicrobial Resistance of *Aeromonas* Strains from Various Retail Food Products in Mumbai, India. **Journal Of Food Science**. p. 486-492. set. 2011.
- NAMDARI, H; BOTTONE, J. Cytotoxin and enterotoxin production as factors delineating enteropathogenicity of *Aeromonas caviae*. **Journal Of Clinical Microbiology**. V.28, n.8, p. 1796-1798. 1990.
- NASCIMENTO, M.S. et al. Effects os different disinfection treatments on the natural microbiota of lettuce. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 66, n.9, p. 1697-1700, 2003.
- NEYTS, K. et al. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. **Letters In Applied Microbiology**. p. 359-363. jul. 2000.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 8th ed. NCCLS document M2-A8., v.23, nº1 replaces M2-A7, v.20, nº1. NCCLS, Wayne, PA, USA 2003.
- NOJIMOTO, I.T.I. 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**, Goiânia, v. 30, n. 5, p.385-388, jul. 1997.
- ODEYEMI, O. A.; AHMAD, A. Antibiotic resistance profiling and phenotyping of *Aeromonas* species isolated from aquatic sources. **Saudi Journal Of Biological Sciences**. p. 65-70, 2017.
- OLIVEIRA, J. F.; CIPULLO, J.P.; BURDMANN, E. A.. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, São José do Rio Preto, v. 21, n. 4, p. 444-452, dez. 2006 .
- OMS, 2013. Organização Mundial da Saúde (2013). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>>. Acesso em 12 jul 2016.
- PALU, A.P. et al. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. **Food Microbiology**. p. 504-509. ago. 2006

PALUMBO, S.; ABEYTA, C.; STELMA, G.; WESLEY, I. W. *Aeromonas*, *Arcobacter*, and *Plesiomonas*. In *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4. Ed. Washington: American Public Health Association – APHA, 2001. 676p. cap. 30, p. 283-290. ISBN 087553-175-X

PAPADAKIS, Vassilios et al. Fulminant *Aeromonas hydrophila* infection during acute lymphoblastic leukemia treatment. **Journal Of Microbiology, Immunology And Infection**. p. 154-157. abr. 2012.

PEIXOTO, L.J.S. et al. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 79, n. 3, p.453-461, jul. 2012.

PEREIRA, C. S. et al. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p.522-526, 2004.

PEREIRA, C. S. et al. Caracterização de *Aeromonas* spp isoladas de neonatos hospitalizados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 2, n. 41, p.179-182, abr. 2008.

PETTIBONE, G. W. Population dynamics of *Aeromonas* spp. in an urban river watershed. **Journal Of Applied Microbiology**. p. 723-730. out. 1998.

PIANETTI, A. et al. Faecal contamination indicators, *Salmonella*, *Vibrio* and *Aeromonas* in water used for the irrigation of agricultural products. **Epidemiol. Infect.** p. 231-238, 2004.

POPOFF, M. et al. Genus III. *Aeromonas* Kluver and Van Niel 1936, 398AL. In: MURRAY, R.G.E.; BRENNER, D. J.; BRYANT, M. P.. **Bergeys Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. Cap. 5. p. 545-548.

PUTHUCHEARY, S. D.; PUAH, S. M.; CHUA, K. H.. Molecular Characterization of Clinical Isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. **Plos One**. p. 1-7. fev. 2012.

RIVERA, Mario E. Díaz et al. Bacterial Assessment on Leaves of Green Vegetable Grown on Hydroponics and its possible Health Risks. **Journal Of Agriculture And Environmental Sciences**. Porto Rico, p. 1-7. dez. 2015.

ROCHA, S. M.. **Estudo da Ocorrência do gênero *Aeromonas* em sistemas de tratamento em esgotos por lagoas de estabilização no Município de Lins - SP**. 2004. 153 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RODRIGUES, J. ***Aeromonas* sp - Incidência em Alimentos e Estudo de característica associada à virulência**.1992. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

SCOARIS, D. O. et al. The Occurrence of *Aeromonas* spp. in the Bottled Mineral Water, well Water and Tap Water from the Municipal Supplies. **Brazilian Archives Of Biology And Techonology**. p. 1049-1055. out. 2008.

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

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**. p. 1924-1925. abr. 2002.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA (Brasil). **Cadeia produtiva de hortaliças movimenta R\$ 55 bi por ano no País**. 2016. Disponível em: <<http://sna.agr.br/cadeia-produtiva-de-hortalicas-movimenta-r-55-bi-por-ano-no-pais/>>. Acesso em: 18 mar. 2017.

SORUM, H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: Aarestrup FM, editor. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, D. C.; 2006. 213–37.

STRATEV, D.; VASHIN, I.; RUSEV, V.. Prevalence and survival of *Aeromonas* spp. in foods – a review. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 10, n. 163, p.486-494, 2012.

SZABO, E.A.; SCURRAH, K. J.; BURROWS, J.M. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. **Letters In Applied Microbiology**. p. 456-460. jun. 2000.

TEUNIS, P.; FIGUERAS, M.J.. Reassessment of the Enteropathogenicity of Mesophilic *Aeromonas* Species. **Frontiers In Microbiology**. p. 1-12. set. 2016.

TEWARI, R. et al. Isolation of *Aeromonas salmonicida* from Human Blood Sample: A Case Report. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**. Delhi, India, p. 139-140. fev. 2014.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

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

TURNER, P. et al. *Aeromonas* spp. Bacteremia in Pregnant Women, Thailand–Myanmar Border, 2011. **Emerging Infectious Diseases**. p. 1522-1523. set. 2012.

UYTTENDAELE, M. et al. Control of *Aeromonas* on minimally processed vegetables by decontamination with lactic acid, chlorinated water, or thyme essential oil solution. **International Journal Of Food Microbiology**. C, p. 263-271. fev. 2004.

VENTURA, R. J. et al. A community-based gastroenteritis outbreak after Typhoon Haiyan, Leyte, Philippines, 2013. **Outbreak Investigation**. p. 1-6. 2015.

VILLARI, P et al. Prevalence and Molecular Characterization of *Aeromonas* spp. in Ready-to-Eat Foods in Italy. **Journal Of Food Protection**. p. 1754-1757. dez. 2000.

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

VIZZOTTO, B. **Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de *Aeromonas* isoladas no Paraná no período de 1999-2009**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

XANTHOPOULOS, V.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Occurrence and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in minimally processed fresh vegetable salads. **Food Control**. p. 393-398. 2010.

WALKER, S. J.; J. BROOKS. Survey of the incidence of *Aeromonas* and *Yersinia* species in retail foods. **Food Control** v. 4 p. 34-40, 1993.

WOLF, S.. **Características de virulência em estirpes de *Aeromonas* spp.** 101 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012

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

WU, CHI-JUNG et al. Incidence of *Aeromonas* bacteremia in southern Taiwan: *Vibrio* and *Salmonella* bacteremia as comparators. **Journal of Microbiology, Immunology And Infection**. Taiwan, p. 145-148. Abril, 2014.

YADAV, A.S., VERMA, S.S. Occurrence of enterotoxigenic *Aeromonas* in poultry eggs and meat. **J. Food Sci. Technol.**, v.35, p.169-170, 1998.

YANO, Y. et al. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds. **Food Microbiology**. p. 21-27. 2015.

ZHANG, QIAN et al. A foodborne outbreak of *Aeromonas hydrophila* in a college, Xingyi City, Guizhou, China, 2012. *Western Pacific Surveillance and Response*, Guizhou, v. 3, n. 4, p.1-5, dezembro, 2012.

ZONG, Z. et al. *Aeromonas hydrophila* infection: clinical aspects and therapeutic options. *Reviews in Medical Microbiology*, Edinburgh, v. 13, p. 151-162, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Amostras coletadas em Campinas-SP (continua)

Data	Convencional	Hidropônica	Minimamente processada
06/04/2015	C2 - Alho poró		
	C4 – Almeirão		
	C5 – Alface		
	C6 - Cheiro Verde	C1 - Alface	C10 - Alface
	C7 - Cheiro Verde	C3 - Alface	C11 - Cheiro Verde
	C8 – Espinafre	C13 - Rúcula	C12 - Cheiro Verde
	C9 – Almeirão	C15 - Rúcula	
	C14 – Escarola		
	C16 – Alface		
	C17 – Almeirão		
10/05/2015	C18 – Rúcula		
	C20 – Couve		
	C21 – Alface		
	C22 - Cheiro verde		
	C23 – Couve	C19 – Alface	C25 - Rúcula
	C29 – Rúcula	C24 – Rúcula	C27 - Couve
	C30 – Alface	C26 – Alface	C28 - Couve
	C31 – Alface		C33 - Alface
	C32 - Cheiro Verde		
	C34 – Couve		
	C35 - Cheiro Verde		
	C36 – Alface		
	C37 – Alface		
09/06/2015	C40 – Alface		
	C41 – Alface		
	C42 – Alface		
	C43 – Alface	C46 - Rúcula	C38 - Alface
	C44 – Espinafre	C47 - Alface	C39 - Cheiro Verde
	C45 – Manjeriçã		
	C48 – Escarola		
	C49 – Alface		
	C50 – Alface		
	C51 – Couve		

Anexo A. Amostras coletadas em Campinas-SP (continuação)

02/07/2015	Não coletado	C52 - Cheiro Verde C53 - Alface C54 - Couve C55 - Rúcula	Não coletado
19/07/2015	C57- Rúcula C61 – Couve C66 – Agrião C69 – Almeirão C70 – Almeirão C75 – Rúcula C78 – Rúcula C79 – Agrião C80 – Agrião	C77 - Cheiro Verde	C56 - Cheiro Verde C58 - Alface C59 - Couve C60 - Almeirão C62 - Cheiro Verde C63 - Rúcula C64 - Couve C65 - Almeirão C67 - Couve C68 - Almeirão C71 - Alface C72 - Agrião C73 - Rúcula C74 - Almeirão C76 - Almeirão
01/09/2015	Não coletado	Não coletado	C81 - Agrião C82 - Rúcula C83 - Rúcula C84 - Agrião C85 - Rúcula
10/12/2015	C86 – Espinafre C87 - Alho poró C88 - Alho poró C89 – Manjericão C91 – Manjericão C92 – Escarola C93 - Alho poró C94 - Alho poró C95 – Espinafre C96 – Agrião C97 - Alho poró C98- Manjericão C99 – Escarola C100 – Manjericão C102 – Espinafre C103 – Escarola	C90 – Rúcula	C101 - Agrião
Total	58	15	30