UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JOSIE ROBERTA TEODORO

POTENCIAL PATOGÊNICO E SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *AEROMONAS* SPP. EM ALIMENTOS PRONTOS PARA O CONSUMO

CAMPINAS
2021

JOSIE ROBERTA TEODORO

POTENCIAL PATOGÊNICO E SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *AEROMONAS* SPP. EM ALIMENTOS PRONTOS PARA O CONSUMO

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profª. Drª. Dirce Yorika Kabuki.

Este arquivo digital corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Josie Roberta Teodoro, e orientada pela Profª. Drª. Dirce Yorika Kabuki.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Gardênia Garcia Benossi - CRB 8/8644

T264p

Teodoro, Josie Roberta, 1982-
Potencial patogênico e susceptibilidade aos antimicrobianos de Aeromonas spp em alimentos prontos para o consumo / Josie Roberta Teodoro. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

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

1. Temaki. 2. Inocuidade dos alimentos. 3. Virulência (Microbiologia). 4. Resistência a antimicrobianos. 5. Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz. I. Kabuki, Dirce Yorika, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Pathogenic potential and antimicrobial susceptibility of Aeromonas spp. in ready-to-eat foods
Palavras-chave em inglês:
Temaki
Food safety
Virulence (Microbiology)
Antimicrobial resistance
Matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry
Área de concentração: Ciência de Alimentos
Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos
Banca examinadora:
Dirce Yorika Kabuki [Orientador]
Ana Lúcia Penteado
Nathália Cristina Cirone da Silva
Data de defesa: 29-04-2021
Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0003-2123-0975
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/8438057172004324

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Drª. Dirce Yorika Kabuki

Faculdade de Engenharia de Alimentos −FEA/UNICAMP

Orientadora

_____

Drª. Ana Lúcia Penteado

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA

Membro titular

_____

Profª. Drª. Nathália Cristina Cirone da Silva

Faculdade de Engenharia de Alimentos- FEA/UNICAMP

Membro titular

A Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Programa de Pós Graduação em Ciências dos Alimentos pela excelência e pela oportunidade de desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro (Processo Nº 130031/2018-6). À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro (Processo Nº 88887.485460/2020-00).

À minha orientadora, Profª. Drª. Dirce Yorika Kabuki, pela orientação e viabilização da execução do meu mestrado, bem como pela confiança em mim depositada.

À minha família pelo suporte e incentivo durante todo esse processo: à minha mãe Ruth e ao meu pai Alberto (*in memorian*) pela base educacional que possibilitou chegar até aqui; ao meu irmão Alberto Filho, pelos conselhos e apoio; e ao meu noivo Odair, por caminhar junto comigo, seja apenas me ouvindo e incentivando como também me acompanhando na saga para compra das amostras e nos trabalhos aos finais de semana.

Aos meus companheiros de laboratório, pelos momentos de descontração e amizade, em especial à Gabriela Guimarães Carvalho por ser minha parceira de cursos, pelas trocas de informações e ajuda na execução dos trabalhos; e à Juliana Carusi, técnica do laboratório, pelo suporte na realização dos experimentos e ao Murilo Mariz Queiroz, pela ajuda nas análises de MALDI-TOF.

Ao Prof. Dr. Carlos Emílio Levy e toda sua equipe do laboratório de microbiologia do HC-UNICAMP pela colaboração na execução da etapa de MALDI-TOF/MS.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em dividir seu tempo e conhecimentos a fim de contribuir para a melhoria desta dissertação.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização e conclusão desse trabalho, fica aqui expressa a minha gratidão!

RESUMO

Aeromonas spp. são considerados patógenos emergentes, podendo causar, entre outras doenças, gastroenterites. Sua principal rota de transmissão é a água, porém diferentes tipos de alimentos podem ser veículos para sua disseminação. O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a presença de *Aeromonas* em alimentos prontos para o consumo. Foram avaliadas amostras de queijos, frutas minimamente processadas e temakis. Como objetivo específico foi verificada a ocorrência das espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii*, identificadas através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), que posteriormente foi comparada com a técnica de espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo (MALDI-TOF/MS). Avaliou-se também o potencial patogênico dos isolados através da detecção dos genes codificadores dos fatores de virulência: *aerA*, codificador da aerolisina; *hlyA*, codificador da hemolisina HlyA; e *act*, *alt* e *ast* codificadores, respectivamente, das enterotoxinas Act, Alt e Ast através de PCR; e verificou-se o perfil de resistência aos antimicrobianos: cefepima, ceftazidima, aztreonam, ciprofloxacino, levofloxacino, tetraciclina, amoxicilina-ácido clavulânico e imipenem pelo método de disco-difusão. *Aeromonas* sp. foi isolada de 66,67% (20/30) das amostras de temakis, 3,23% (1/31) das de frutas minimamente processadas e em nenhuma (0/30) das de queijo. Entre os isolados a prevalência foi de 26,39% de *A. caviae*, 20,83% de *A. hydrophila*, 8,34% de *A. veronii* e 44,44% foram classificadas como *Aeromonas* sp.(outras espécies não identificadas). As contagens variaram de menor do que $1,0x10^2$ a $2,6x10^5$UFC. g^{-1}. Entre os genes de virulência analisados, *aerA* apresentou a maior frequência ocorrendo em 47,2% (34/72) dos isolados, seguido de *act* em 41,7% (30/72), os genes *hlyA* e *alt* apresentaram se em 38,9% (28/72) e o gene *ast* em 18,1% (13/72). Dezessete perfis de virulência foram encontrados entre os isolados e *A. hydrophila* foi a espécie que apresentou todos os genes ao mesmo tempo, considerada, assim, a mais virulenta. Os isolados apresentaram 90% de resistência a amoxicilina-ácido clavulânico, 17% a tetraciclina, 10% ao imipenem e 3% ao aztreonam. A comparação da identificação por MALDI-TOF/MS com a PCR para as espécies *A. caviae*, *A. hydrophila* e *A. veronii* obtiveram correspondência de 92,86%, 84,62% e 83,33%, respectivamente. Estes resultados demonstraram que os temakis são veiculadores de *Aeromonas* spp. potencialmente patogênicas, devido à

ocorrência em altas contagens e por apresentar genes de virulência e, por isso, devem ser evitados por crianças, idosos, grávidas e pessoas imunocomprometidas.

Palavras-chave: Temaki, Frutas Minimamente Processadas, Queijo, Inocuidade dos alimentos, Virulência (Microbiologia), Resistência a antimicrobianos, MALDI-TOF/MS, PCR.

ABSTRACT

Aeromonas spp. are considered emerging pathogens and can cause, among other diseases, gastroenteritis. Its main route of transmission is water, but different foods can be vehicles for its dissemination. The present work aimed to evaluate the presence of *Aeromonas* in ready-to-eat foods. Samples of cheeses, minimally processed fruits and temakis were evaluated. As a specific objective, the occurrence of the species *A. hydrophila*, *A. caviae* and *A. veronii* was identified, through the polymerase chain reaction (PCR) technique, which was later compared with the matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) technique. The pathogenic potential of the isolates was also evaluated by detecting the genes encoding virulence factors: *aerA*, aerolysin coder; *hlyA*, hemolysin encoder HlyA; and *act*, *alt* and *ast* encoding, respectively, the Act, Alt and Ast enterotoxins by PCR; and the antimicrobial resistance profile was verified: cefepime, ceftazidime, aztreonam, ciprofloxacin, levofloxacin, tetracycline, amoxicillin-clavulanic acid and imipenem by disk-diffusion method. *Aeromonas* sp. was isolated from 66.67% (20/30) of the samples of temaki, 3.23% (1/31) of the minimally processed fruits and in none (0/30) of the cheese. Among the isolates, the prevalence was *A. caviae* (26.39%), *A. hydrophila* (20.83%), *A. veronii* (8.34%) and 44.44% were classified as *Aeromonas* sp.(other unidentified species). Counts ranged from less than $1.0X10^2$ to $2.6X10^5$ $UFC.g^{-1}$. Among the virulence genes analyzed, *aerA* presented the highest frequency, occurring in 47.2% (34/72) of the isolates, followed by *act* in 41.7% (30/72), the *hlyA* and *alt* genes were found in 38.9% (28/72) and the *ast* gene in 18.1% (13/72). Seventeen virulence profiles were found among isolates and *A. hydrophila* was the species that presented all the genes at the same time, considered, thus, the most virulent. The isolates showed 90% resistance to amoxicillin-clavulanic acid, 17% to tetracycline, 10% to imipenem and 3% to aztreonam. The results obtained by comparing the identification by MALDI-TOF/MS with PCR for the species *A. caviae*, *A. hydrophila* and *A. veronii* obtained correspondence of 92.86%, 84.62%, 83.33%, respectively. These results demonstrated that the temakis are carriers of *Aeromonas* spp. potentially pathogenic, due to the occurrence in high counts and presentation of virulence genes and that´s why should be avoided by children, the elderly, pregnant women and immunocompromised people.

Key-words: Temaki, Minimally Processed Fruits, Cheese, Food Safety, Virulence (Microbiology), Antimicrobial resistance, MALDI-TOF/MS, PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema de funcionamento do MALDI-TOF/MS.....38
Figura 2. Esquema de isolamento e contagem de *Aeromonas* sp. 42
Figura 3. Distribuição das espécies de *Aeromonas* sp. por grupo de amostras.....61
Figura 4. Prevalência dos genes de virulência (*act*, *alt*, *ast, aerA e hlyA)* nos isolados.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisão por classes das β-lactamases produzidas por *Aeromonas*.....35
Tabela 2. Características bioquímicas e morfológicas do gênero *Aeromonas* sp. ...43
Tabela 3. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados na PCR convencional para confirmação do gênero *Aeromonas* sp. 44
Tabela 4. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados na PCR multiplex para identificação das espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii*.....45
Tabela 5. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para identificação dos genes codificadores dos fatores de virulência 47
Tabela 6. Antibióticos testados e valores de referência para determinação de resistência de *Aeromonas* sp. aos antimicrobianos.....49
Tabela 7. Orientação de interpretação dos resultados obtidos nas análises de concordância de Kappa.....50
Tabela 8. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em alimentos prontos para consumo.....51
Tabela 9. Relação entre a porcentagem de amostras positivas e o estabelecimento de origem da amostra de temaki.....52
Tabela 10. Detecção e Contagem de *Aeromonas* sp. em meio Ágar *Aeromonas* e Ágar Amido Ampicilina para amostras positivas de temaki e frutas minimamente processadas (melão).....56
Tabela 11. Análise de Kappa para verificar a concordância entre detecção e contagem no meio de cultura ágar *Aeromonas* (AA).....57
Tabela 12. Análise de Kappa para verificar a concordância entre detecção e contagem no meio de cultura ágar amido ampicilina (SA) 57
Tabela 13. Análise de Kappa para verificar a concordância entre contagem e detecção no meio de cultura ágar *Aeromonas* (AA) por categoria de alimentos.....58
Tabela 14. Análise de Kappa para verificar a concordância entre contagem e detecção no meio de cultura ágar amido ampicilina (SA) por categoria de alimentos 58
Tabela 15. Análise de Kappa para verificar concordância entre os meios de cultura AA e SA na detecção de *Aeromonas* spp. 59
Tabela 16. Comparação pareada, através do teste de Wilcoxon, entre as contagens de *Aeromonas* spp. obtidas em meio ágar *Aeromonas* (AA) e ágar amido ampicilina (SA).....60

Tabela 17. Teste de Kappa para verificar a concordância entre os métodos de identificação PCR e MALDI-TOF/MS.....62
Tabela 18. Descrição das espécies identificadas por PCR e MALDI-TOF/MS e a associação entre esses resultados.....63
Tabela 19. Frequência, total e por categoria de alimento, dos perfis de virulência identificados nos isolados.....65
Tabela 20. Teste do qui-quadrado para verificar a associação dos genes *alt*, *ast*, *act*, *aerA* e *hlyA* com a espécie de *Aeromonas* pesquisadas.....66
Tabela 21. Perfil de virulência associado à amostra, à espécie e ao estabelecimento de origem da amostra.....68
Tabela 22. Frequência do perfil de susceptibilidade dos antibióticos testados em porcentagem (%).....71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ágar *Aeromonas*.

AMC: Amoxicilina ácido-clavulânico.

ATM: Aztreonam.

BAM: *Bacteriological Analytical Manual.*

bp: pares de bases.

BrCast:Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade antimicrobiana.

cAMP: Adenosina monofosfato cíclico.

CAZ: Ceftazidima.

CIP: Ciprofloxacino.

CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute.*

CPM: Cefepima.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético.

GCAT:glicerofosfolipídeo-colesterol aciltransferase.

HC-UNICAMP: Hospital das clínicas da Universidade Estadual de Campinas.

IN: Instrução Normativa.

IPM: Imipenem.

LPS: Lipopolissacarídeos.

LVX: Levofloxacino.

MALDI-TOF/ MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry):* Espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo.

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

NA: Ágar nutriente.

NaCl: Cloreto de sódio.

PCR:Reação em Cadeia da Polimerase.

PFGE: *Pulsed-field gel Eletrophoresis.*

PMQR: *Plasmid Mediated Quinolone Resistance.*

QRDR: *Quinolone-resistence Determining Region*.

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

rRNA:RNA ribossômico.

SA (*Starch-ampicillin agar*): Ágar amido ampicilina.

SP: São Paulo.

TBE: Tris/Borato/EDTA.

TSA: Ágar Tripticase de soja.

TSBA: Caldo Tripticase de soja suplementado com ampicilina.

TSB: Caldo Tripticase de soja.

TET: Tetraciclina.

UFC: unidades formadoras de colônia.

UV: Ultravioleta.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17

2. OBJETIVOS 19

2.1. Objetivo geral 19

2.2. Objetivos específicos 19

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20

3.1. Características das bactérias do gênero *Aeromonas* 20

3.2. Patogenicidade de *Aeromonas* spp. em humanos 21

3.3. Fatores de virulência 24

3.4. Ocorrência de *Aeromonas* em alimentos 26

3.4.1. Pescados 27

3.4.2. Lacticínios 29

3.4.3. Frutas e verduras 30

3.4.4. Alimentos prontos para o consumo 32

3.5. Resistência aos antimicrobianos e fatores que a influenciam 34

3.6. Espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo (MALDI-TOF/MS) 37

4. MATERIAL E MÉTODOS 41

4.1. Amostras 41

4.2. Contagem e Detecção de *Aeromonas* sp. 41

4.3. Identificação dos isolados 43

4.3.1. Extração de DNA 43

4.3.2. PCR convencional para identificação do gênero 44

4.3.3.PCR multiplex para identificação das principais espécies 44

4.3.4. Eletroforese 45

4.3.5. Espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo (MALDI-TOF/MS) 46

4.4. Determinação do potencial de patogenicidade 46

4.5. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos 48

4.6 . Análise estatística 49

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 51

5.1. Ocorrência e identificação por PCR de *Aeromonas* spp. em alimentos prontos para o consumo.....51

5.2. Identificação dos isolados através de MALDI-TOF/MS.....62

5.3. Perfil de virulência dos isolados 63

5.4. Susceptibilidade aos antimicrobianos 69

6. CONCLUSÕES.....74

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....76

8. APÊNDICES 85

A- Amostras adquiridas no comércio da cidade de Campinas-SP. 85

B- Detalhamento das frutas minimamente processadas. 89

C-Teste do qui-quadrado para verificar associação do tipo de peixe e os resultados das contagens e detecções 90

D-Comparação múltipla de Kruskal-Wallis para verificar associação entre os valores de contagens em meio AA e SA e o tipo de temaki. 90

E- Comparação de Kruskal-Wallis para verificar associação entre o total de virulência e a espécie de *Aeromonas*. 90

9. ANEXOS..... 91

A- Padrões microbiológicos para alimentos RDC N°12 de 2 de janeiro 2001. ...91

B- Padrões microbiológicos para alimentos RDC N°331 (IN N°60) de 23 de dezembro de 2019. 93

C- Comprovante do cadastro no sistema SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado).....95

1. INTRODUÇÃO

Aeromonas spp. são bactérias autóctones e amplamente distribuídas em ambientes aquáticos (IGBINOSA et al., 2012). Foram classificadas, em meados dos anos 70, dentro de dois principais grupos: *Aeromonas* psicrofílicas imóveis que infectam peixes e répteis; e um grupo muito maior de *Aeromonas* mesófilas móveis, que estão associadas a doenças humanas (BERGEY; HOLT, 1993; JANDA; ABBOTT, 2010; PARKER; SHAW, 2010; FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

Hoje, são reconhecidas como agentes etiológicos responsáveis por uma variedade de infecções (JANDA; ABBOTT, 2010), especialmente as gastroenterites, embora outras doenças de cunho mais grave possam ocorrer em menor frequência e são relacionadas à imunossupressão do paciente (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2003). A patogenicidade está relacionada com a habilidade de secretar diversos tipos de fatores extracelulares tais como hemolisina, enterotoxinas, citotoxinas, lipases e proteases (PRAVEEN et al., 2016).

Alguns estudos têm mostrado que algumas espécies de *Aeromonas* estão se tornando patógenos de crescente importância em alimentos (ISONHOOD; DRAKE, 2002; STRATEV; VASHIN; RUSEV, 2012; ALHAZMI, 2015; TAVARES; CERESER; TIMM, 2015; GONÇALVES PESSOA et al., 2019; HOEL; VADSTEIN; JAKOBSEN, 2019). Assim, embora o ambiente aquático seja uma rota muito importante na disseminação, diferentes alimentos, especialmente peixes e frutos do mar, carnes fresca ou cozida, frango, vegetais, leites e derivados podem ser potenciais veículos causadores de infecções tanto em humanos como em animais (PRAVEEN et al., 2016).

Aeromonas sp. é capaz de sobreviver e multiplicar em baixas temperaturas em uma variedade de produtos alimentares estocados entre -2 e 10°C e podem produzir fatores de virulência mesmo nessas condições (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2003). Outra peculiaridade é a habilidade de crescer na presença de 6,5% de cloreto de sódio, embora a faixa ótima de crescimento seja de 0 a 4%. Também possuem capacidade de crescer em sistemas de distribuição de água, formando biofilmes, nos quais podem ser resistentes ao processo de cloração (IGBINOSA et al., 2012).

Em 2020 entrou em vigor a RDC n°331 complementada pela IN n°60, de 23 de dezembro de 2019 (Anexo B)(BRASIL, 2019), legislação que substituiu a RDC n°12 de 2 de janeiro de 2001 (Anexo A)(BRASIL, 2001). Ambas dispõem sobre os padrões microbiológicos de alimentos, mas nenhuma contempla um padrão para *Aeromonas* spp. para nenhum grupo de alimentos listado.

Existem evidências de que a prevalência de infecções por *Aeromonas* pode estar subestimada em países em desenvolvimento, devido ao fato de ser um micro-organismo estreitamente relacionado com o ambiente aquático e por motivos sociais, parte da população está sujeita a condições propicias a exposição a esses patógenos vinculados à água e alimentos (IGBINOSA et al., 2012). Outro indício de substimação é a dificuldade em se realizar o diagnóstico, pela utilização de meios de cultura inadequados em laboratórios clínicos, especialmente pela falta de meios seletivos para amostras mistas, o que pode levar a uma identificação errada (HOEL; VADSTEIN; JAKOBSEN, 2019)

O seu papel como agente etiológico em casos de diarreia ainda é controverso, mas vários casos e pequenos surtos têm sido relatados evidenciando a sua capacidade de provocar diarreia. Existem também relatos de co-infecção, ou seja, aliado a algum outro patógeno, nos quais há indícios que podem causar diarreia ou agravar o quadro infeccioso (LI et al., 2015).

Assim, o objetivo do trabalho é realizar um estudo investigativo da prevalência de espécies patogênicas *de Aeromonas* sp*.* ao homem em alimentos prontos para o consumo, com a finalidade de entender melhor a sua disseminação nestes alimentos, e contribuir para a avaliação do risco de infecção oferecido por eles.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é avaliar a prevalência de *Aeromonas* spp. em alimentos prontos para o consumo e caracterizar os isolados provenientes destes alimentos.

2.2. Objetivos específicos

Realizar isolamento e contagem de *Aeromonas* spp. através das técnicas microbiológicas tradicionais, utilizando dois meios de cultura, ágar amido ampicilina e ágar *Aeromonas*, a fim de comparar o desempenho dos mesmos.

Verificar a ocorrência, através de PCR, das seguintes espécies de *Aeromonas: A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii,* em alimentos prontos para o consumo que não requerem aquecimento antes de sua ingestão.

Comparar a identificação dos isolados de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* realizada com PCR multiplex a identificação realizada com a técnica de MALDI-TOF/MS.

Investigar o potencial patogênico dos isolados através da detecção dos principais genes codificadores de fatores de virulência: *aerA*, codificador da aerolisina; *hlyA*, codificador da hemolisina HlyA; e *act*, *alt* e *ast* codificadores, respectivamente, das enterotoxinas Act, Alt e Ast.

Verificar o perfil de resistência dos isolados aos antimicrobianos: cefepima, ceftazidima, aztreonam, ciprofloxacino, levofloxacino, tetraciclina, amoxicilina-ácido clavulânico e imipenem.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Características das bactérias do gênero *Aeromonas*

Atualmente, pertencem ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Aeromonadales e família *Aeromonadaceae*; nos quais também estão inclusos os gêneros *Oceanimonas* e *Tolumonas* (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005; PARKER; SHAW, 2010). Inicialmente foram classificadas junto à família *Vibrionaceae*, porém estudos realizados por Colwell et al. (1986) utilizando o 16S rRNA, 5S rRNA e hibridização do rRNA-DNA demonstraram uma divergência evolutiva que era aproximadamente equidistante das famílias *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae*, o que justificou a criação de sua própria família (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005).

O gênero *Aeromonas* consiste em bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, apresentam a forma de bacilos retos com extremidades arredondadas, podendo, às vezes, aparecer na forma de cocobacilos. Os bacilos medem cerca de 0,3-1,0 X 1,0-3,5 µm e podem ser encontrados isolados, em pares ou até mesmo em cadeias curtas. São móveis devido a presença de flagelos polares, com alguma evidência de flagelo lateral, porém algumas espécies são consideradas imóveis. São anaeróbias facultativas e quimiorganotróficas. Possui metabolismo fermentativo ou respiratório, sendo este último com o oxigênio sendo aceptor de elétrons universal. São redutoras de nitrato, mas não desnitrificantes. Sais de amônio são utilizados pela maioria dos isolados como fonte de nitrogênio. São produtoras de oxidase e catalase. A maioria é resistente ao fator vibriostático O/129 (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005).

Segundo a nona edição do *Manual Bergey de Determinação Bacteriológica* (1993) e confirmado por diversos autores, o gênero foi dividido em dois grandes grupos: *Aeromonas* psicrofílicas imóveis, representadas pela *Aeromonas salmonicida*, que possui temperatura ótima de crescimento entre 22-25°C, e infecta peixes e répteis; e um grupo muito maior de *Aeromonas* mesófilas móveis, que possui temperatura ótima de crescimento entre 35-37°C, e estão associadas a doenças humanas, como *Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae* e *Aeromonas veronii* (JANDA; ABBOTT, 2010; PARKER; SHAW, 2010; FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

O gênero é conhecido por possuir cepas difíceis de diferenciar umas das outras, particularmente quando a identificação é baseada apenas em métodos fenotípicos (ARAVENA-ROMÁN et al., 2011). Pois o comportamento variável das cepas acaba ocasionando erros nas identificações. Métodos de identificação molecular, como o sequenciamento de genes *housekeeping* e sua análise filogenética concatenada (*Multilocus Phylogenetic Analysis* - MLPA) auxiliaram na correta identificação de novas espécies (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

Atualmente, na literatura podemos listar 36 espécies diferentes, são elas: *A. allosaccharophila, A. aquatica, A. aquatilis, A. australiensis, A. bestiarum, A. bivalvium, A. cavernicola, A. caviae, A. crassostreae, A. dhakensis, A. diversa, A. encheleia, A. enterica, A. eucrenophila, A. finlandiensis, A. fluvialis, A. hydrophila, A. intestinalis, A. jandaei, A. media, A. molluscorum, A. lacus, A. lusitana, A. piscicola, A. popoffi, A. rivipollensis, A. rivuli, A. salmonicida, A. sanarellii, A. schubertii, A. simiae, A. sobria, A. taiwanensis, A. tecta, A. trota, and A. veronii* (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

São bactérias autóctones e amplamente distribuídas no ambiente aquático (IGBINOSA et al., 2012), podendo ocorrer em água fresca, esgoto, água salobra e água potável clorada ou não. Além disso, podem ser encontradas em diversos animais aquáticos e terrestres, podendo causar doenças a vários animais homeotérmicos e pecilotérmicos (PARKER; SHAW, 2010).

Aeromonas spp. podem sobreviver e se multiplicar em baixas temperaturas (-2 até 10°C), sendo capazes de produzir fatores de virulência nessas condições (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2003). Podendo até mesmo ser recuperada de alimento armazenado a -20°C por anos (ABRAHIM et al., 2007).

3.2. Patogenicidade de *Aeromonas* spp. em humanos

Inicialmente, o gênero era reconhecido apenas por causar doenças sistêmicas em animais pecilotérmicos, como peixes e outros animais de sangue frio (JANDA; ABBOTT, 2010). A primeira vez que o gênero *Aeromonas* foi considerado um patógeno humano foi em 1954, num ataque fulminante de miosite, a partir do qual foi isolado do sangue, pulmões, fígado, baço, urina, fluido cefaloespinhal e partes necrosadas do músculo estriado de uma mulher jamaicana imunocomprometida (PARKER; SHAW, 2010; VON GRAEVENITZ, 2007). Porém,

atualmente, já foi reportado como causador tanto de gastroinfecções como também de infecções extraintestinais, tais como lesões cutâneas; infecções respiratórias, de sangue e do trato urogenital; septicemia, entre outras (IGBINOSA et al., 2012; JANDA; ABBOTT, 2010).

Ainda existe muita discussão sobre o papel do gênero *Aeromona*s como agente causador de diarreias, devido ao fato de seu comportamento não se encaixar de forma completa aos postulados de Koch (VON GRAEVENITZ, 2007). Uma vez que o terceiro postulado diz que a doença específica deve ser reproduzida a partir da inoculação de uma cultura pura em um hospedeiro sadio, porém não há um modelo animal estabelecido que reproduza a gastroenterite associada a *Aeromonas* (JANDA; ABBOTT, 2010). Contudo, seu isolamento proveniente de fezes de indivíduos com diarreia nos quais não havia a presença de nenhum outro patógeno indica o gênero como agente causador (PEIXOTO et al., 2012).

Gastroenterites são as infecções mais comumente causadas por *Aeromonas*, o quadro pode ser assintomático, caso de infecções leves, diarreias aquosas e autolimitadas, e em alguns casos severos podem ser semelhantes a uma infecção por cólera e apresentar sintomas tais como febre, dor abdominal, diarreia sanguinolenta acompanhadas de desidratação (BHOWMICK; BHATTACHARJEE, 2018). Essas infecções frequentemente envolvem mais de um tipo de bactéria na mesma amostra clínica, fato que é denominado de polimicrobiana ou infecção mista. No caso de gastroenterites, as mais frequentes associações ocorrem com *Campylobacter* e *Salmonella.* As espécies de *Aeromonas* mais reportadas, na microbiologia médica, como sendo causadoras de gastroenterites são: *A. caviae, A. dhakensis, A. veronii* e *A. hydrophila,* mas essa ocorrência pode variar de acordo com o país (HOEL; VADSTEIN; JAKOBSEN, 2019; FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). Zhou et al. (2019), em um estudo epidemiológico realizado, no período de 2015 a 2017, em 115 amostras clínicas provenientes do hospital geral de Pequim (China), descreveram que as espécies mais prevalentes em amostras de infecções intestinais foram *A. caviae* (43,9%), *A. veronii* (35,7%) e *A*. *dhakensis* (12,2%) e as mais prevalentes em infecções extraintestinais, *A. hydrophila* (29,4%), *A. caviae* (29,4%) e *A. dhakensis* (23,5%).

No Brasil, Hofer et al.(2006) relatou o envolvimento de *Aeromonas* em um surto de diarreia aguda, no ano de 2004, na cidade de São Bento do Una (Pernambuco), um município com saneamento básico precário. Foram registrados

2.170 casos de diarreia no período de janeiro a julho; 582 coproculturas foram realizadas dentro do período de março a junho, destas 145 (25%) registraram a presença de um patógeno causador, dos quais 114 eram *Aeromonas*, destacando as espécies *A. caviae*, *A. veronii biovar sobria* e *A. veronii biovar veronii.* Anos mais tarde, Silva et al. (2017) realizaram uma nova classificação das espécies, através da análise filogenética baseada no alinhamento dos genes 16S rRNA e *gyrB*, das amostras provenientes deste surto e verificaram a prevalência de *A. caviae* (64,1%), *A. veronii* (17,5%), *A. aquariorum* (10,7%), *A. trota* (3,9%) *A. hydrophila* (1,9%) e *A. jandaei* (1,9%) e compararam estes resultados com amostras ambientais de água (também coletadas na época do surto) cuja prevalência foi de *A. caviae* (81,3%), *A. hydrophila* (12,5%). A análise filogenética mostrou estreita relação filogenética entre os isolados clínicos e ambientais.

Em 2012, ocorreu em Xingyi (China) um surto associado ao consumo de alimento, no qual mais de 200 estudantes doentes apresentaram quadro de diarreia aguda. Ao fim da investigação, foi constatado que o tanque de lavagem de vegetais estava com refluxo, recirculando água suja que contaminava com *Aeromonas* sp. os vegetais ali lavados e servidos em saladas frias aos estudantes, desencadeando as infecções (ZHANG et al., 2012).

Na literatura, também são relatados casos pontuais, como descrito por Nikiforov et al. (2014) em um estudo de caso de um senhor de 61 anos de idade, imunocomprometido devido a um histórico de abuso de álcool e pancreatite. Esse senhor, após ingestão de ostras cruas, apresentou quadro de náuseas, vômito e dor abdominal evoluindo para sepse. Exames de coprocultura revelaram a presença de *Aeromonas hydrophila* como causadora da gastroenterite. O antibiograma revelou sensibilidade do micro-organismo à ciprofloxacina. Devido ao correto diagnóstico e posologia, o idoso imunocomprometido se recuperou, salientando assim, a importância da pesquisa desse agente etiológico como patógeno.

Aeromonas spp. que possuem fatores de virulência podem ser encontradas no ambiente e nos alimentos, mas só causarão gastroenterites se sua presença estiver acima da dose infectante (IGBINOSA et al., 2012). Podem infectar tanto imunocompetentes como imunocomprometidos. Pesquisas demonstram que a dose infectante de *A. hydrophila* para pessoas e animais é maior do que 10 unidades formadoras de colônias (UFC). Sua natureza ubíqua torna continua sua interação com seres humanos. É considerado um patógeno oportunista, assim a

dose infectante é menor para indivíduos imunocomprometidos e para aqueles que estejam sobre tratamento com antibióticos (PARKER; SHAW, 2010). Além disso, a gastroenterite provocada pelo gênero é um problema na população pediátrica, ocorrendo principalmente em crianças abaixo de 3 anos de idade (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). Também são susceptíveis mulheres grávidas e adultos mais velhos (HOEL; VADSTEIN; JAKOBSEN, 2019).

A doença transmitida por alimentos contaminados com *Aeromonas* spp. pode ser resultado não apenas da colonização do micro-organismo no hospedeiro, mas também causada pelo fato de liberarem toxinas secundárias durante sua multiplicação no alimento (STRATEV; VASHIN; RUSEV, 2012). Além disso, o gênero *Aeromonas* produz diversos fatores de virulência, por essa razão a infecção pode ser considerada complexa e multifatorial (PEIXOTO et al., 2012).

3.3. Fatores de virulência

Para se ter sucesso como patógeno, o micro-organismo necessita entrar no hospedeiro, vencer as barreiras naturais, encontrar um nicho específico, evitar os mecanismos de defesa e produzir a doença. No caso das gastroenterites por *Aeromonas*, a via de infecção é oral, através da ingestão de água ou alimentos contaminados. Os processos interrelacionados para a infecção são: locomoção direcionada→ ligação com o epitélio gastrointestinal→ adesão→ colonização → infecção, podendo utilizar se de fatores de virulência para resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro ou causar danos ao mesmo (IGBINOSA et al., 2012; JANDA; ABBOTT, 2010).

Para acontecer a infecção é necessária a adesão na célula hospedeira e posterior proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro. Os componentes estruturais envolvidos nesse processo de colonização são: o flagelo, o pili, a cápsula, a camada S, e lipopolissacarídeos (LPS) (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020). Sendo assim, para a entrada e o estabelecimento, dois componentes têm importantes papéis: o flagelo e o pili. *Aeromonas* produz dois tipos de flagelo: um flagelo polar (Pof) e um lateral (Laf); também possui dois tipos de pili, o tipo I e o tipo IV. O flagelo polar induz o mecanismo de natação (*swimming*) pelos meios líquidos, enquanto o flagelo lateral induz o mecanismo de movimentação em enxame (*swarming*) (JANDA; ABBOTT, 2010). O pili está envolvido nas funções de

adesão, formação de biofilme, agregação celular, invasão da célula hospedeira e transferência de DNA (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

Após aderida, a bactéria conta com a camada S, que forma uma espécie de envelope envolvendo a bactéria; com a cápsula para resistir a fagocitose e ao sistema complemento e com o LPS que está envolvido com a organização e manutenção da membrana externa, com a virulência da bactéria e com a produção da resposta inflamatória não específica do hospedeiro (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

Uma vez estabelecida, aparentemente a produção de diarreia pode ocorrer pela produção de enterotoxinas, causando enterites; ou pela invasão do epitélio gastrointestinal, causando disenterias ou colites. Também é considerado que ambos possam acontecer (JANDA; ABBOTT, 2010).

Aeromonas produzem vários tipos de exotoxinas, os dois tipos principais de enterotoxinas descritos são as citotóxicas e as citotônicas (CHOPRA; HOUSTON, 1999; FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020; TOMÁS, 2012).

As enterotoxinas citotóxicas, também conhecidas como enterotoxinas citolíticas, codificadas pelo gene *act*, provocam degeneração das criptas e vilosidades do intestino delgado. Elas são sintetizadas na forma de uma pré proteína, a qual é secretada através da membrana na forma inativa, a proteína é ativada por corte proteolítico e, assim que ativada, se liga a glicoproteína da célula alvo provocando a formação de poros na membrana celular do hospedeiro, causando a morte celular e consequentemente degeneração no tecido (TOMÁS, 2012).

As enterotoxinas citotônicas não provocam a degeneração epitelial do intestino delgado, e têm seu mecanismo de ação similar ao das toxinas coléricas, pois aumentam os níveis de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e prostaglandinas nas células epiteliais intestinais (TOMÁS, 2012). As espécies de *Aeromona*s produzem citotôxinas com pesos moleculares diferentes e reatividade variável às toxinas colérica e são divididas em 2 grupos: as termolábeis (56°C/10min), codificadas pelo gene *alt*, sem reatividade cruzada com a antitoxina colérica e as termoestáveis (100°C/30min), codificadas pelo gene *ast*, que apresenta reatividade cruzada com a antitoxina colérica (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020).

Com relação a atividade hemolítica, *Aeromonas* produzem duas classes de hemolisinas: α-hemolisinas e β-hemolisinas. As α-hemolisinas são sintetizadas na fase de crescimento estacionário e produzem efeitos citotóxicos reversíveis e lise incompleta de eritrócitos. Já as β-hemolisinas são sintetizadas na fase de crescimento exponencial, são termoestáveis e formadoras de poros que causam lise osmótica e completa destruição de eritrócitos (TOMÁS, 2012).

Aerolisina e Hemolisina são dois tipos de β-hemolisinas (JANDA; ABBOTT, 2010). A aerolisina possui propriedade citolítica, cujo mecanismo de ação consiste em ser exportada para o exterior da bactéria na forma de uma pré-toxina, e posteriormente ativada por enzimas proteolítica digestivas. Desta forma, são capazes de se ligar a células eucarióticas formando poros em sua membrana e provocando sua lise (HOWARD et al., 1987), é codificada pelo gene *aerA.* A hemolisina HlyA, também conhecida por AHH1, possui ação semelhante, é codificada pelo gene *hlyA* e é homologa a hemolisina HlyA do *V. cholerae* (HEUZENROEDER; WONG; FLOWER, 1999).

Alperi & Figueras (2010) descreveram toxinas Shiga codificadas pelos genes *stx1* e *stx2* que podem causar diarreia, colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica.

Aeromonas também são produtoras de proteases, lipases e enzimas como colagenase, elastase e enolase que auxiliam na invasão da célula hospedeira ou na sobrevivência da bactéria; também podem sequestrar o ferro do hospedeiro e armazená-lo em sideróforos, para não serem privadas desse nutriente essencial durante o processo de infecção. Além disso, seis tipos de sistema de secreção foram descritos, e estão envolvidos com o transporte de fatores de virulência para o meio extracelular ou diretamente para a célula hospedeira (TOMÁS, 2012).

3.4. Ocorrência de *Aeromonas* em alimentos

Não somente o meio aquático é o responsável pela disseminação do gênero *Aeromonas*; diferentes tipos de alimentos, especialmente peixes e frutos do mar, mas também carne crua ou cozida, frango, vegetais, leites e derivados também o são (PRAVEEN et al., 2016). Mesmo porque, sendo a água um importante disseminador, e seu uso indispensável no processamento dos alimentos, é um fator que facilita a contaminação (TAVARES; CERESER; TIMM, 2015). Assim, as maiores

rotas de disseminação são: meio ambiente, água, animais e a ingestão de alimentos contaminados (IGBINOSA et al., 2012).

A ocorrência dessas bactérias nos alimentos também está associada à deterioração dos alimentos congelados. No caso de produtos cárneos, a atmosfera modificada influencia no crescimento do gênero, uma vez que demais competidores são inibidos, possibilitando o seu crescimento; já no caso de produtos sem atmosfera modificada, *Aeromonas* pode crescer aerobiamente, especialmente se a microbiota for reduzida por cozimento ou outro tipo de tratamento. A deterioração também está associada ao fato de secretarem fatores de virulência extracelulares em baixas temperaturas (BUCHANAN, ROBERT L; PALUMBO, 1985).

3.4.1. Pescados

O ambiente aquático é *habitat* da bactéria *Aeromonas*, podendo ser encontrada tanto em água doce quanto salgada (IGBINOSA et al., 2012). Também há relatos de surto em águas estuarinas como ocorrido nos rios Levuo, Musa e Nevezis situados no norte da Lituânia, em 2008. Nesse surto *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* matou massivamente peixes da espécie *Perca fluviatilis*, conhecido popularmente como poleiro Europeu, durante a estação de outono, na qual a temperatura dos rios marcava a média de 6°C (SKRODENYTE-ARBAČIAUSKIENE et al., 2010).

Esse é um problema muito recorrente na aquicultura e ocorrem não somente pelo fato dessa bactéria estar inserida no ambiente aquático, mas também porque os peixes infectados disseminam a doença, como relatado por Skrodenyte-Arbaciauskiene et al. (2012) através de um experimento no qual comprovou que peixes contaminados da espécie *Perca fluviatilis* conseguiam passar a infecção, através da água, para peixes saudáveis da mesma espécie e para uma espécie diferente (*Salmo trutta trutta,* conhecida como truta do mar). Além disso, outros fatores, associados ao cultivo em cativeiro, favorece ainda mais essa disseminação, tais como o aumento da densidade populacional, manejo inadequado, qualidade da água e nutricional (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017).

Assim sua ocorrência já fora relatada em diversos locais, com espécies variadas de peixes, tais como o relato de surtos ocorridos por *A. hydrophila* em 2009 e recorrente em 2010, em aquacultivos de peixes-gato no oeste do Alabama nos

Estados Unidos (PRIDGEON et al., 2013); ocorrido na Escola de ciências veterinárias da Universidade Nacional do Rosário, na Argentina, no qual *A.sobria* infectou peixes da espécie *Rhamdiaquelen* (COSCELLI et al., 2017).

Há relatos também de surtos causados por mais de uma espécie, como o que aconteceu em 2017 na cidade de Chongqing, na China, causado por *A. hydrophila* e *A. veronii* em aquicultura de *Myxocyprinus asiaticus* (LI et al., 2019); e surtos por co-infecção de *Aeromonas* com outro patógeno, como ocorreu em 2018 na província de Sichuan, na China, no qual foram detectados *A.veronii* e *Saprolegnia ferax* infectando peixes da espécie *Paramisgurnus dabryanus* (DU et al., 2020).

No Brasil, estima-se que 15% da produção provenientes do aquacultivo seja perdida em decorrência, direta ou indireta, de parasitas e surtos de doença (que inclui o gênero *Aeromonas*), o que significa, aproximadamente, US$ 84 milhões por ano. Porém, essas são estimativas, uma vez que há deficiência de registros, portanto a mortalidade em grande escala, embora realidade, raramente é documentada (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017). Foram registrados surtos por *A. caviae* em cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus),* em 2000 no estado de São Paulo (MARTINS, 2008); e por *A. hydrophila* em cultivo de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma fasciatum*), em 2009 no Mato Grosso do Sul (DA SILVA et al., 2012).

Assim sabemos que o gênero é um problema frequente quando se trata de aquicultura, mas trabalhos mostram que a ocorrência de *Aeromonas* perdura no pescado que é comercializado. Castro-Escarpulli et al. (2003) caracterizaram *Aeromonas* spp. isoladas de peixes congelados destinado ao consumo humano no México. A partir de 250 amostras analisadas foram isoladas culturas apresentando fatores de virulências tais como aerolisina/hemolisina, lipases (incluindo glicerofosfolipídeo-colesterol aciltransferase- GCAT), serina protease e DNases.

A prevalência de *A. hydrophila* em peixes e camarões, no mercado de peixes de Coimbatore, na Índia, foi observada por Vivekanandhan et al. (2005). O estudo, realizado, no período de junho de 1997 a maio de 1999, constatou a prevalência de 33,58% em peixes e 17,62% em camarões e a ocorrência de variações de prevalência devido a sazonalidade e por parte do corpo dos animais, nas quais a maior prevalência foi nas amostras de intestino, seguidas das amostras de superfícies do corpo e brânquias.

Abrahim et al. (2007) avaliaram a incidência do gênero *Aeromonas* em peixes marinhos e no ambiente de venda desses produtos no norte da Grécia, no período de setembro de 2003 a maio de 2004, de 120 amostras de peixe, foram isoladas 65 culturas das quais 28%, 24% e 12% pertenciam, respectivamente, as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria.* Em 100 amostras do ambiente e de trabalhadores dos mercados, foram isoladas 69 culturas, das quais 25%, 26%, 13% pertenciam, respectivamente, as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*.

No Brasil, Silva et al. (2010) avaliaram, por um período de quatro meses, a qualidade do pescado vendido na cidade de São Paulo, 20 amostras de peixes de variadas espécies foram compradas e analisadas para identificação de diversos micro-organismos patogênicos, incluindo *Aeromonas*. O resultado demonstrou que 50% das amostras analisadas continham a bactéria. Sessenta e seis cepas foram isoladas, das quais 63,6% foram identificadas apenas como *Aeromonas* spp.; 18,2% como *A.allosaccharophila*; 7.6% como *A*. *caviae*; 7,6% como *Aeromonas veronii biovar sobria* e 3% como *A. hydrophila*.

3.4.2. Lacticínios

Alguns estudos mostram a presença de *Aeromonas* spp. em produtos lácteos. *Aeromonas* foi detectada em 28,5% e 32% das amostras de leite pasteurizado e queijos brancos industrializados, respectivamente, adquiridos, no período de outubro de 1990 a março de 1991, em supermercados da cidade do Rio de Janeiro, Brasil (FREITAS et al., 1993). As espécies *A. caviae* (58,9%), *A. hydrophila* (12,8%), *A. schubertii* (2,5%) foram encontradas em leites, e as espécies *A. hydrophila* (26,9%), *A. caviae* (7,6%), *A. sobria* (3,8%) em queijos. As cepas de *A. hydrophila* e *A. sobria* foram as que apresentaram altos índices de resultados positivos para a produção de hemolisina, citotoxina e atividade estafilolítica. Apesar do tratamento de pasteurização recebido, os autores atribuíram os achados a contaminação pós-tratamento.

Melas et al. (1999) avaliaram a frequência de *Aeromonas* em leite cru e produtos lácteos encontrados no Norte da Grécia. Para este estudo foram coletadas 138 amostras de leite de vaca e 57 de ovelha, ambos crus, de 90 produtores localizados em diversas regiões da Macedônia, e no comércio local, 80 amostras de leite pasteurizado, 39 de queijo Antótiros, 36 de queijo Manouri, 23 de queijo Feta e

15 de arroz doce. Os resultados demonstraram maior ocorrência de *Aeromonas* em leite cru, sendo 40,5% (56/138) em leite de vaca e 35% (20/57) em leite de ovelha, se opondo a nenhum achado em leite pasteurizado, queijo Feta e arroz doce. Foram encontrados 10,25% (4/39) de amostras de queijo Antótiros positivas e 8,33% (3/36) de queijo Manouri cujas contaminações foram atribuídas ao pós-processamento, uma vez que as condições de processamento são letais ao micro-organismo.

Outro estudo, no Brasil, Bulhões & Rossi (2002) analisaram 160 amostras de "queijo de Minas" artesanal adquiridos nos municípios de Poços de Caldas-MG e Jaboticabal-SP. Foram isoladas cepas de *Aeromonas* de 51,2% das amostras, que apresentavam contagem entre $5X10^3$ e $4X10^5$ UFC/grama. Foram encontradas as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. schubertii,* além de cepas atípicas. No mesmo ano foi publicado um estudo que avaliou, na cidade do Rio de Janeiro, 45 amostras de queijo, originárias de 3 marcas diferentes, nas quais 17,7% foram positivas para *Aeromonas* spp. (ARAÚJO et al., 2002).

Yucel et. al (2005) verificaram a ocorrência de *Aeromonas* spp. em leites e produtos lácteos em Ancara, na Turquia. Um total de 338 amostras foram avaliadas, das quais 65 de 132 amostras (49,2%) de leite vendido a granel, 10 de 25 (40%) de leite vendido na rua, 5 de 31 (16%) de leite pasteurizado e 12 de 150 (8%) de queijo branco foram positivos para *Aeromonas* spp. As espécies mais frequentes foram *A. hydrophila*, seguida de *A. caviae* e *A. sobria*.

Carneiro & Rossi Jr (2006) fizeram um trabalho de rastreabilidade do gênero *Aeromonas* em uma granja de beneficiamento de leite tipo A, localizada no interior do estado de São Paulo- Brasil. De 80 amostras obtidas em diferentes pontos do processo, encontraram resultado positivo em 46,25% delas, das quais 90% no leite cru, 30% na saída da pasteurização, 40% no tanque de abastecimento da máquina de empacotamento e 25% nas amostras de produto final. Entre as espécies encontradas estavam: *A. sobria* (40,54%), *A. hydrophila* e *A. caviae* (ambas 21,62%), *A. veronii* (10,81%) e *A. schubertii* (2,7%). Os autores atribuíram o alto índice de ocorrência a falhas no processo, especialmente na obtenção do leite.

3.4.3. Frutas e verduras

Não foram encontrados, na literatura, trabalhos relacionando a *Aeromonas* spp. exclusivamente em frutas minimamente processadas. Porém,

Ghenghesh et al. (2005) avaliaram a qualidade microbiológica, no período de fevereiro a junho de 2020, de 146 amostras de suco de frutas vendidos na cidade de Trípoli, na Líbia, nos quais o pH variavam entre 3,09 e 6,24 (média geral 3,82), e foram encontrados 3 (2,1%) isolados de *Aeromonas* spp., em sucos de uva, pêssego e abacaxi.

Na Austrália, um estudo conduzido por Szabo et al.(2000) pesquisaram a presença dos patógenos do gênero *Listeria*, *Aeromonas* e *Yersinia* em 120 amostras de saladas de alface prontas para o consumo, adquiridas em 5 supermercados e diretamente coletada de um produtor, por um período de 8 meses (outubro de 1997 a maio de 1998). Os resultados obtidos indicaram a prevalência de *Yersinia* e *Aeromonas*, sendo que este último micro-organismo foi encontrado em 88 amostras, sendo em 66 delas *A. hydrophila* ou *A. caviae* e em 14 *A. sobria*.

Na cidade de Tessalônica, Grécia, Xanthopoulos et al. (2010) avaliaram 26 tipos de saladas prontas, produzidas por 5 fabricantes diferentes, coletadas em supermercados locais, para verificar a ocorrência de *Aeromonas hydrophila* e *Yersinia enterocolitica*. Os estudos apresentaram uma prevalência de *Aeromonas* spp. de 61,5% nas amostras analisadas, sendo mais de 80% classificadas como *A. hydrophila*.

Uma pesquisa no período de julho de 2007 a agosto de 2008, em Lisboa (Portugal), avaliou a incidência dos principais patógenos alimentares em 151 amostras de saladas minimamente processadas. As amostras foram adquiridas em 2 supermercados e eram compostas de 38 alfaces romanas, 12 espinafres e 101 saladas prontas para consumo preparadas com três ou quatro ingredientes, tais como escarola, radicchio, canónigos, alface verde, alface roxa, rúcula, cenoura, milho, repolho, chicória e nozes. *A. hydrophila* foi identificada em 11 amostras (7,28%) e em oito delas a contagem foi acima de 10^5 UFC/g (SANTOS et al., 2012).

A ocorrência de *Aeromonas* sp. em água de irrigação e vegetais provenientes do município de Capão Bonito (SP) e em vegetais adquiridos no comércio da cidade de Campinas (SP) foi investigado por Carusi (2017), no período de dezembro de 2014 a março de 2016. Os resultados obtidos demonstraram a presença de *Aeromonas* em 66,7% (12/18) das amostras de água, em 35,1% (26/74) das amostras de vegetais de Capão Bonito e em 53,4% (55/103) das amostras de vegetais de Campinas. Além disso, apresentaram perfis de virulência

variados, sendo a ocorrência do gene *alt* a mais frequente (70,2%) no isolados, seguido dos genes *ast* (53,7%), *aerA* (45,5%), *hlyA* (37,2%) e *act* (32,2%).

Morgado et al.(2018), em Portugal, verificaram a qualidade microbiológica de duas produtoras de vegetais prontos para o consumo. Os produtos escolhidos foram alface iceberg picado, tomate fatiado e manga picada. No estudo, para cada lote produzido, foram analisadas 5 amostras, a primeira era coletada no primeiro dia de produção e as demais durante sua *shelf-life*. Os resultados obtidos foram expressos de acordo com o guia de valores para alimentos prontos para consumo do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Portugal, que classifica as amostras como satisfatórias, aceitáveis ou insatisfatórias; para *Aeromonas*, como não estava determinado no guia, foi feito uma comparação com os valores de contagem de colônias aeróbicas. De todos os micro-organismos analisados, *Aeromonas hydrophila* foi o que apresentou os maiores índices de "produto insatisfatório", tanto nas amostras iniciais como finais, demonstrando que o uso desse parâmetro, como um indicador de qualidade, deve ser melhor equacionado. Dos produtos avaliados, o tomate foi o que apresentou menor carga microbiana para este micro-organismo. Todas as amostras iniciais de manga e alface, assim como as amostras finais de manga foram consideradas insatisfatórias. O índice final da alface, passou para 90,91% de amostras insatisfatórias.

3.4.4. Alimentos prontos para o consumo

Villari et al. (2000) estudaram a prevalência de *Aeromonas* spp. em alimentos prontos para o consumo (vegetais, queijo, produtos cárneos e sorvete) na cidade de Nápoles na Itália. Do total de 320 amostras, 14,4% foram positivas para *Aeromonas*. A maior porcentagem de isolamentos ocorreu entre os vegetais; entre os queijos, foi a ricota e entre os produtos cárneos, foram o salame e o presunto cru, seguidos da mortadela. Não houve detecção do gênero nas amostras de sorvete. A identificação foi realizada através de *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) no qual foram encontradas as seguintes espécies: *A. hydrophila* (8,4%), *A. caviae* (7,2%) e *A. sobria* (0,3%).

Di Pinto et al.(2012) avaliaram a ocorrência de *Aeromonas* spp. e os genes de virulência associados a ela em 81 amostras de alimentos prontos para o consumo feitos de frutos do mar, provenientes de diversos mercados localizados na

região da Apúlia-Itália, no período de julho de 2009 a junho de 2010. A frequência encontrada foi de 90,5% (19/21) em sushi, 85,7% (18/21) em saladas de frutos do mar, 91,7% (11/12) em surimi, 75% (9/12) em camarões descascados e não foram detectadas nas saladas de polvo (0/6) e anchovas marinhas (0/9). Foram confirmados 156 isolados de *Aeromonas* spp. os quais 151 positivos para a enterotoxina Alt (gene *alt)*, 3 para a enterotoxina Ast (gene *ast)*, sendo que 2 isolados apresentavam os genes simultaneamente. Os genes *hlyA* e *aerA*, respectivamente das enterotoxinas hemolisina e aerolisina não foram encontrados.

Hoel et al.(2015) avaliaram a qualidade microbiológica de sushis vendidos embalados em supermercados, como alimentos prontos para o consumo. Foram avaliadas 58 amostras de 3 produtores diferentes (24 amostras do A, 21 amostras do B e 13 amostras do C) adquiridas no varejo da Noruega. Das amostras analisadas, 48% foram consideradas insatisfatórias devido a altas contagens de bactérias aeróbicas (média de 6,1 log UFC/g), *Aeromonas* spp. foi detectada em 71% dos produtos analisados (com média de contagem entre 2,7 e 3,3 log UFC/g). Um ano depois, um estudo mais detalhado foi realizado com o produtor A: amostras de peixe e dos ingredientes de um produtor foram coletadas separadamente e analisadas, a média das contagens de mesófilos baixou para 5,1 log UFC/g e *Aeromonas* spp. foi encontrada em 67% dos produtos analisados, sendo positivos nas carnes de linguado e nas cebolinhas (com média de contagem 3 log UFC/g). Posteriormente, Hoel, Vadstein e Jakobsen (2017) identificaram as *Aeromonas* provenientes do trabalho acima citado, das 118 cepas isoladas 74% foram de *A. salmonicida*, seguidas por *A. bestiarum* (9%), *A. dhakensis* (5%), *A. caviae* (5%), *A. media* (4%), *A. hydrophila* (2%) e *A. piscicola* (1%). O potencial patogênico das mesmas mostrou que a ocorrência do gene codificador da hemolisina (*hlyA*) foi o que apresentou maior frequência (99% dos isolados), seguido do da aerolisina (*aerA*) (98%), enterotoxina citotóxica (*act*) (86%), enterotoxina citotônica termolábil (*alt*) (99%) e enterotoxina citotônica termoestável (*ast*) (31%). Os genes *stx1* e *stx2* também foram pesquisados, porém não foram encontradas.

Abd-El-Malek (2017) avaliou a incidência e virulência de *Aeromonas* em peixes, tanto na matéria prima quanto em produto final, comprados em supermercados e restaurantes situados em Assiut, no Egito. Foram analisadas tilápias selvagens do Nilo, tilápias do Nilo cultivadas em cativeiro, tilápias grelhadas, tilápias fritas (25 unidades de cada tipo de amostra), além de 25 unidades de bagres

(*Bagrus bayad*) fritos. *Aeromonas* spp. foi isolada em 40% das tilápias selvagens e em 36% das cultivadas em aquicultura, já nos alimentos prontos para consumo, esse índice diminui, mas ainda assim, foi detectada em 16% das tilápias fritas, em 28% das grelhadas e em 20% dos bagres fritos, que segundo autor, poderiam ser resultado de contaminação cruzada. As espécies encontradas foram *A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae*. Quanto aos fatores de virulência, a atividade hemolítica foi verificada em 91,4% dos isolados, a proteolítica em 77,1% e a lipídica em 17,1%.

3.5. Resistência aos antimicrobianos e fatores que a influenciam

No Brasil uma revisão sistemática sobre a resistência a antimicrobianos em bactérias isoladas de ambientes aquáticos, foi realizada por Nascimento & Araújo (2014), e os dados encontrados revelaram que o gênero *Aeromonas* é o micro-organismo mais estudado, devido ao fato de estar intimamente relacionado como causador de infecções em peixes em lagoas de aquicultura, o que pode impactar em prejuízos na produção.

A principal fonte de antibióticos em ambientes aquáticos provém da descarga de águas residuais, descarte de resíduos e antimicrobianos utilizados na aquicultura. A contaminação ambiental pode selecionar cepas bacterianas resistentes e genes de resistência que podem ser passadas a patógenos humanos (NASCIMENTO; ARAÚJO, 2014).

Os sistemas de produção de alimentos de forma mais integrada ou mais intensiva podem acarretar a disseminação de resistências antimicrobianas no meio ambiente. A aquicultura intensiva se não pautada em boas práticas pode afetar a homeostasia e levar ao estresse fisiológico do animal, favorecendo o aparecimento de doenças infecciosas e necessitando de utilização de antibióticos para seu combate, o que gera a liberação de resíduos orgânicos e inorgânicos no ambiente (GASTALHO; SILVA; RAMOS, 2014). Assim, muitas vezes, os piscicultores utilizam antibióticos para o controle de doenças ou até mesmo como promotores de crescimento, porém seu uso indiscriminado aumenta a seleção de espécies resistentes (PEIXOTO et al., 2012), bem como sua utilização em concentrações subinibitórias. Desta maneira, esses antibióticos que têm sido usados na produção animal, podem selecionar resistências antimicrobianas tanto em bactérias comensais do intestino animal e até mesmo em humano, pela ingestão desse

alimento, bem como em bactérias do meio ambiente (GASTALHO; SILVA; RAMOS, 2014).

Algumas *Aeromonas* possuem genes de resistência a determinados antibióticos que podem ser transferidos para outras bactérias (PEIXOTO et al., 2012). Esses genes de resistência são mediados por cromossomos, mas também podemos encontrar outros codificados por plasmídeos e integrons (STRATEV; ODEYEMI, 2016).

Aeromonas são conhecidas por produzirem diferentes β-lactamases, das classes A a D (Tabela 1), dependendo da espécie, as quais lhes conferem resistência a um amplo espectro de antibióticos β-lactâmicos (FOSSE; GIRAUD-MORIN; MADINIER, 2003; HUMPHRIES; SCHUETZ, 2015; STRATEV; ODEYEMI, 2016). A presença de genes de resistência em elementos móveis, tais como plasmídeos, transposons e integrons, facilita seu espalhamento entre as bactérias. Os genes de resistência podem ser transmitidos por três vias: transformação, transdução e conjugação (STRATEV; ODEYEMI, 2016).

Tabela 1. Divisão por classes das β-lactamases produzidas por *Aeromonas.*

Classe	Alvo/Resistência	Características
A	Amplo espectro a β-lactamases	• Resistência a todas as penicilinas, cefalosporinas e monobactamas, mas não a cefamicinas e carbapenêmicos; • São inativados pelos inibidores de β-lactamase; • Esta classe também pode ser plasmídeo-mediada.
B	Metalo-β-lactamases	• Resistência por penens e carbapenens, mas não penicilinas e cefalosporinas.
C	Cefalosporinase	• Podem hidrolisar muitas β-lactamas, como cefamicinas e cefalosporinas de segunda e terceira geração; • São resistentes aos inibidores de β-lactamase, como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam.
D	Pelicilinases	• Hidrolisam penicilinas.

Fonte: adaptado de Stratev & Odeyemi, 2015.

Outra classe de antimicrobiano estudada contra *Aeromonas* é a da tetraciclina. Já foram descritas, para o gênero, a presença de diversas classes de determinantes de resistência (*tet* A a E) em plasmídeos. Os genes de resistência à esse antibiótico costuma fazer parte de transposons, os quais conseguem mudar sua localização e, por exemplo, se inserir em plasmídeos (SCHMIDT et al., 2001).

O gênero *Aeromonas* é quase que universalmente susceptível à fluoquinolonas, mas resistência a classe, embora raras, têm sido relatadas (JANDA; ABBOTT, 2010). Plasmídeos mediadores de resistência à quinolonas, conhecidos por *Plasmid Mediated Quinolone Resistance* (PMQR) são encontrados, apesar desses genes conferirem baixas taxas de resistência a quinolonas/fluoquinolonas, eles contribuem para a seleção de genes de resistência originários das mutações espontâneas na região determinante de resistência à quinolona (*QRDR- Quinolone-resistance determining region*) (POIREL; CATTOIR; NORDMANN, 2012). O acúmulo desses elementos tem efeito sinérgico que permite, proporcionalmente, maior período de exposição da bactéria ao antimicrobiano (RUIZ; PONS; GOMES, 2012).

Na área médica, o Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade antimicrobiana (BrCast) preconiza critérios de análise da susceptibilidade antimicrobiana a serem utilizados em laboratórios clínicos para o gênero *Aeromonas* sp. Os antibióticos indicados para o teste são: cefepima, ceftazidima (ambos cefalosporinas); aztreonam (monobactâmico), ciprofloxacino, levofloxacino (ambos fluoroquinolonas) e sulfametoxazol-trimetoprim (sulfomanidas) (BrCast, 2019).

Para o uso na aquicultura brasileira, atualmente, estão cadastrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) apenas produtos contendo os antimicrobianos florfenicol (anfenicol) e oxitetraciclina (tetraciclina). O Ministério da Pesca e da Aquicultura através da Instrução Normativa n°30 de 30 de dezembro de 2014 (BRASIL, 2015) estabeleceu o programa nacional de monitoramento de resistência a antimicrobianos em recursos pesqueiros, regulamentada pela Portaria 444 de 30 de dezembro de 2014 (BRASIL, 2015b) que estabeleceu o monitoramento de resistência aos antimicrobianos: amoxicilina, florfenicol, norfloxacina e oxitetraciclina, além do monitoramento epidemiológico de alguns micro-organismos, entre eles, *Aeromonas* mesofílicas.

Assim, como o mal uso dos antimicrobianos exercem pressão de seleção dos genes de resistência, outro fator que também contribui para isso é a contaminação do meio ambiente por metais pesados, cuja resistência normalmente

está localizada em plasmídeos. Há relatos que esta resistência pode estar associada a genes de resistência a antibióticos (PEIXOTO et al., 2012). Diante desse cenário, dois fatores têm levado muitos pesquisadores a avaliar a susceptibilidade do gênero *Aeromonas* a antimicrobianos: uma constante preocupação do reflexo dessa resistência afetar o tratamento de suas infecções e também pelo fato de *Aeromonas* representar um potencial reservatório de genes de resistências aos demais patógenos.

3.6. Espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo (MALDI-TOF/MS)

As informações genéticas de uma célula microbiana se traduzem em milhões de proteínas, a análise dessas proteínas reflete os produtos gênicos e as funções metabólicas (SINGHAL et al., 2015). Assim, há muito tempo já se sabia que era possível identificar um micro-organismo através do seu conjunto de proteínas, porém essa identificação era economicamente inviável até o aparecimento do MALDI-TOF/MS que permitiu identificar micro-organismos através de suas proteínas totais a um custo que se resume a um investimento inicial para a aquisição do equipamento, mas cujos reagentes são baratos (SENG et al., 2010).

A necessidade de preparação da amostra antes da análise depende da fonte de procedência da amostra ou do tipo de composição da parede celular. Alguns micro-organismos, normalmente bactérias gram-negativas, podem ser identificados diretamente adicionando apenas a solução matriz e posterior leitura no equipamento, já outros necessitam de uma prévia extração com ácido fórmico (SINGHAL et al., 2015).

O procedimento é bastante simples: a amostra a ser analisada pelo MALDI/MS é preparada sendo fixada em um composto orgânico absorvente de energia, denominado matriz. Quando a matriz cristaliza, na secagem de sua aplicação, o mesmo acontece com a amostra. No equipamento, são emitidos feixes de raio laser sobre a amostra, que é desorvida e ionizada, esses íons se separam com base na razão massa/carga (m/z), possibilitando sua identificação através de um analisador de massas. Existem vários tipos de analisadores de massas, na identificação de micro-organismos, o mais comumente usado é o analisador por tempo de voo (*time of flight* - TOF). Assim, para que os analitos sejam identificados,

esses íons protonados são acelerados, através da aplicação de um potencial fixo, e passam por um tubo de voo. A relação m/z é medida através da determinação do tempo necessário para o analito percorrer esse caminho e isso gera um espectro com as características das massas dos peptídeos (Figura 1). Essas características espectrais são denominadas impressão digital em massa de peptídeos. A identificação do micro-organismo desconhecido é feita através da comparação do espectro gerado com um banco de dados (SENG et al., 2010; SINGHAL et al., 2015).

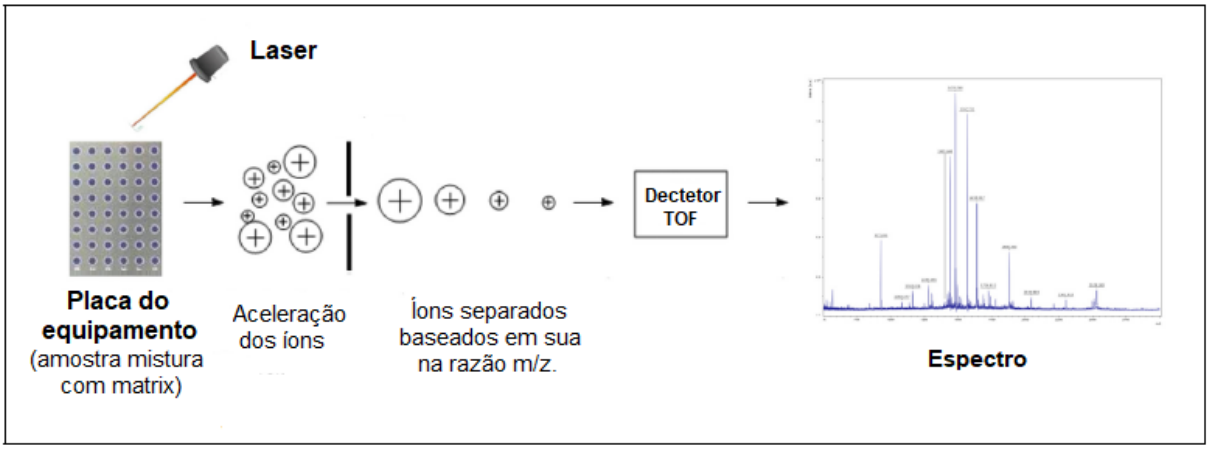

Figura 1. Esquema de funcionamento do MALDI-TOF/MS (Fonte: adaptado de SINGHAL et al.,2015).

Os bancos de dados utilizados são próprios de cada fabricante, esta seria uma desvantagem da metodologia, se compararmos com o banco de dados dos ácidos nucléicos, que são públicos e livres. Existe também a possibilidade do usuário criar seu próprio banco de dados. Porém, há várias vantagens na utilização do método, a primeira é a rapidez na identificação frente as metodologias tradicionais de cultura, o que pode ser muito valioso para o tratamento de pacientes, por exemplo, no caso de septicemia a cada uma hora de demora para o tratamento, aumenta-se a mortalidade de 10 a 20% (PASTERNAK, 2012). Além da identificação de patógenos em amostras clínicas, ambientais e de alimentos, a metodologia permite a detecção e identificação de agentes utilizados em guerras biológicas, detecção de resistência antimicrobiana, e tipagem de estirpes bacterianas. Pode ser usada na área da bacteriologia, virologia e micologia (SINGHAL et al., 2015).

Porte et al.(2017) avaliaram a performace de duas marcas de espectrômetros de massas, Microflex LT (BrukerDaltonics) e Vitek MS (BioMerieux), em 804 isolados clínicos: 252 *Enterobacteriaceae*, 126 não-fermentadores, 36 outros

bacilos gram-negativos, 279 cocos gram-positivos, 32 bacilos gram-positivos, 32 anaeróbicos e 47 leveduras. As duas marcas apresentaram 98% de identificação correta a nível de gênero, Vitek apresentou melhor desempenho frente ao Microflex, em termos de identificação de espécies (85% vs 81%, respectivamente) e de complexos de espécies (93% vs 87%). Para o gênero *Aeromonas*, foram analisadas 5 isolados, a marcaVitek identificou apenas o gênero para todos os isolados e a marca Microflex identificou 4 isolados a nível de gênero e 1 a nível de espécie (*A. media*).

Outro estudo clínico, para o gênero *Aeromonas* foi executado por Shin et al. (2015), que compararam quatro métodos para a identificação dos mesmos: análise bioquímica, sequenciamento do 16s rRNA, sequenciamento de genes *housekeeping* (*gyr*B, *rpo*B) e MALDI-TOF/MS analisando 65 isolados provenientes de pacientes do Hospital Universitário da Corea. Concluíram que os dois primeiros métodos identificaram com precisão apenas o gênero, o sequenciamento dos genes *housekeeping* foi método de maior precisão, mas o MALDI-TOF/MS também apresentou boa performace, identificando 92,3% (60/65) dos isolados à nível de espécie e 6,2% (4/65) dos isolados somente à nível de gênero.

Outros estudos, também foram publicados, não somente para amostras clínicas, mas também ambientais e provenientes de alimentos. Alguns afirmam que a metodologia é muito boa para a especiação dos isolados. Lamy et al. (2011) avaliaram 171 isolados, sendo 90 clínicos, 49 ambientais e 32 cepas de referências por serem isolados já identificados através de sequenciamento parcial do gene *rpoB*. O MALDI-TOF/MS identificou corretamente ao nível de gênero todas as culturas. Já para a espécie, a precisão foi de 90% (81/90), 93,9% (46/49) e 90,6% (29/32), respectivamente para os isolados clínicos, ambientais e de referência.

Elbehiry et al. (2019) avaliaram a presença de *Aeromonas* em 150 amostras, sendo 75 de água e 75 de frango, coletadas na região de Al-Qassim, na Arábia Saudita. Os isolados provenientes dessas amostras foram identificados através da análise bioquímica utilizando o sistema Vitek 2 (BioMérieux), do MALDI-TOF/MS e da técnica de RT-PCR esta última somente para as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*. Os resultados do MALDI foram tratados por análise dos componentes principais (PCA) e comparados com a identificação do RT-PCR, para verificação da precisão da técnica de caracterização proteômica, assim,

dos resultados obtidos a precisão foi de 21/22 (95,45%) para identificação de *A. hydrophila*, 12/12 (100%) para *A. caviae* e 9/9 (100%) para *A. sobria*.

Há também publicações que não concordam com a eficiência do método para identificação das espécies, afirmando que a metodologia é eficiente apenas para identificação do gênero. Vávrová et al.(2015) avaliaram 64 cepas de referência contendo 27 espécies de *Aeromonas*, com o objetivo de verificar a eficiência na identificação por MALDI-TOF/MS das espécies *A. cavernicola*, *A. diversa*, *A. fluvialis*, *A. rivuli*, *A. sanarellii*, e *A. taiwanensis.* Foram relatadas altas porcentagens de falsos positivos, identificações incorretas e inconclusivas.

Perez-Sancho et al.(2018) realizaram um estudo para avaliar a identificação por Maldi-TOF/MS de isolados de *Aeromonas* provenientes de peixes infectados. Neste Trabalho, 151 isolados, previamente identificadas em espécies através do sequenciamento do *rpoD*, foram submetidas a técnica de análise proteômica, que primeiramente foi classificada apenas pelos dados provenientes do aparelho e depois suplementado com dados de padrões. Todos os isolados foram identificados corretamente até o nível de espécie, uma vez que para uma amostra foram identificadas mais de uma espécie com alta taxa de confiança (score≥2,000). E embora os autores tenham suplementado o banco de dados do equipamento, adicionando novos exemplares para aumentar os parâmetros de análise, isso não foi suficiente para garantir maior precisão na identificação das espécies mais prevalentes encontradas nas infecções por *Aeromonas* em peixes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras

As amostras foram adquiridas em estabelecimentos comerciais, tais como supermercados, varejões e restaurantes, situados na cidade de Campinas-SP. Foram analisados três tipos de alimentos prontos para o consumo: queijo (dos tipos frescal e ricota), frutas minimamente processadas (fatiadas e em saladas de frutas) e temaki (de peixes branco, salmão e atum). Nos apêndices A e B temos um detalhamento das amostras adquiridas e da composição das frutas minimamente processadas, respectivamente.

Um total de 91 amostras foram analisadas, sendo 30 amostras de queijo, 31 de frutas minimamente processadas e 30 de temakis. Ao adquirir os produtos queijo e frutas minimamente processadas foram observados se os mesmos estavam dentro da data de validade estipulada pela fabricante. Para os temakis foi dada a preferência da aquisição dos três tipos de recheio (salmão, atum e peixe branco) em um mesmo estabelecimento e em um mesmo dia, assim foi comprado, dentre os recheios preestabelecidos, os que estavam disponíveis no momento, além disso, todos foram preparados pelo estabelecimento na hora da compra. As amostras foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo e imediatamente transportadas até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos para análise no mesmo dia.

4.2. Contagem e Detecção de *Aeromonas* sp.

As amostras foram analisadas conforme metodologia do *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* da *American Public Health Association* (PRIDGEON et al., 2015) modificada com a introdução do meio de cultura ágar *Aeromonas* (AA) (ANDELOVÁ et al., 2006; RODRIGUES, 2007). Primeiramente, vinte e cinco gramas da amostra foram homogeneizadas com 225 mL de caldo tripticase de soja (Sigma-Aldrich), suplementado com 30 mg/L de ampicilina (InLab) (TSBA), em *stomacher* por 2 minutos. Para quantificação, foram feitas diluições decimais seriadas em água peptonada (peptona [BD] a 0,1%) até 10^{-4}. Após, 0,1 mL de cada diluição foi espalhado na superfície de cada um dos

meios: ágar amido ampicilina (*Starch-ampicillin agar* - SA) formulado segundo Buchanan; Robert; Palumbo (1985) e suplementado com ampicilina (InLab) 10mg/L e ágar *Aeromonas* (AA) (Sigma-Aldrich) suplementado com ampicilina (InLab) 5mg/L e as placas foram incubadas a 28°C por 24h. Após incubação, as colônias características (as que apresentaram em ágar SA coloração amarela/cor de mel com formação de halo evidenciado pela adição de lugol; e em meio AA apresentaram bordas esverdeadas com centro verde escuro a cinza) foram estriadas em ágar nutriente (NA) (Merck) para obtenção de colônias puras, as quais foram transferidas em NA inclinado para posteriores testes bioquímicos (Figura 2).

Para a detecção, o TSBA foi incubado a 28°C e após 24h, uma alçada foi estriada em AA e em SA. As placas também foram incubadas a 28°C por 24h. As colônias características em ágar SA e em AA foram observadas e 5 foram estriadas em NA para obtenção de colônias puras e após, foram transferidas em NA inclinado para posterior testes bioquímicos (Figura 2).

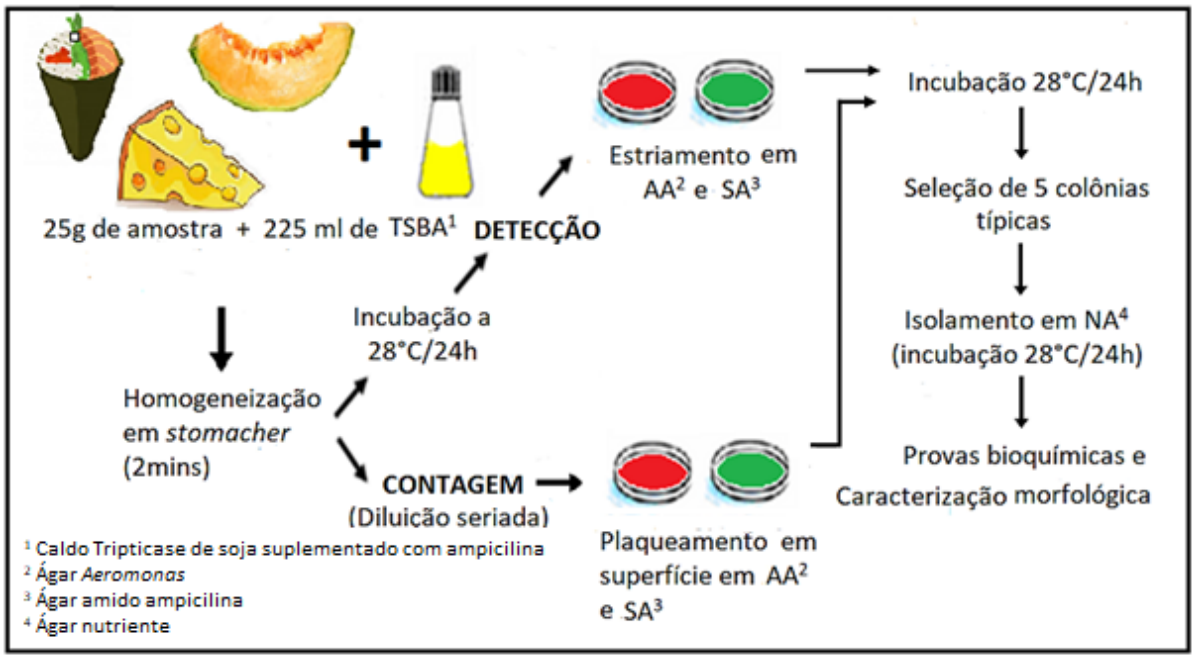

Figura 2. Esquema de isolamento e contagem de *Aeromonas* sp.

4.3. Identificação dos isolados

A identificação dos isolados foi realizada em três etapas: primeiramente foi feito uma triagem preliminar, através da realização das provas bioquímicas de catalase, oxidase (Laborclin), e fermentação do inositol, além da caracterização morfológica, através de coloração de Gram (PRIDGEON et al., 2015); assim os isolados que apresentaram conformidade com a Tabela 2 foram submetidos à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a identificação do gênero (MENDES-MARQUES; HOFER; LEAL, 2013).

Tabela 2. Características bioquímicas e morfológicas do gênero *Aeromonas* sp.

Teste	Catalase	Oxidase	Fermentação do inositol	Coloração de Gram
Resultado	(+)	(+)	(-)	Bacilos /Cocobacilos Gram-negativos

Os isolados confirmados como *Aeromonas* sp. foram submetidas a outro PCR, desta vez multiplex, para a identificação das espécies *A. hydrophila, A. caviae e A. veronii* (PERSSON et al., 2015), e também analisados por Espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo (MALDI-TOF/MS).

4.3.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada conforme metodologia descrita por Carusi (2017). Para isso, a bactéria alvo da extração, foi cultivada em caldo tripticase de soja (TSB) (Sigma-Aldrich) a 28°C por 24 horas. Uma alíquota de 600µL foi centrifugada a 12.000 X g por 10 minutos (centrífuga HettichMikro, modelo 185), separando a massa celular do sobrenadante, que foi descartado. A massa celular foi ressuspendida em 100µL de tampão Tris EDTA (10 mM de Tris- InLab e 1 mM de EDTA- Invitrogen) e submetida a banho de 100°C por 10 minutos, posteriormente resfriada, em banho de gelo, e centrifugada a 12.000 X g por 1 minuto. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um microtubo.

Uma alíquota foi analisada no espectrofotômetro (Biodrop µLite; Biochrom) para verificação da qualidade de DNA extraído. A proporção A260/280 nm foi utilizada para determinar a absorbância de pureza e a faixa de aceitação da extração foi de 1,8 a 2,0 (SAFFACHE, 2014). Após esta verificação, o restante foi armazenado a -20°C para posterior identificação e pesquisa de genes de virulência por PCR.

4.3.2. PCR convencional para identificação do gênero

Os isolados triados nas provas bioquímica e na caracterização morfológica foram submetidos a confirmação do gênero a nível molecular através de PCR convencional, no qual foi utilizado um conjunto de oligonucleotídeos específicos para amplificação do gene codificador da subunidade menor 16S rRNA de acordo com a metodologia de Mendes-Marques et al. (2013) com modificações.

O mix da PCR, com volume total de 25µL, foi constituído de 0,5 µL de amostra de DNA; 12,5µL de PCR master mix (Promega); 0,2 µM de cada oligonucleotídeo (Invitrogen), cuja sequência e tamanho do produto está listado na Tabela 3. As condições operacionais do termociclador (Applied biosystem, Thermo Fisher Scientific) foram as seguintes: etapa inicial de 3 min de a 94 ° C; 35 ciclos de 94 ° C durante 60 s, 55 ° C por 60 s, e 72 ° C por 60 s; e etapa final de 5 min a 72° C.

Tabela 3. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados na PCR convencional para confirmação do gênero *Aeromonas* sp.

Oligonucleotídeo	Sequência	Tamanho do produto
16S-f	5'-ACGCAGGCGGTTGGATAAGT-3'	~600
16S-r	5'- GGCAACAAAGGACAGGGGT-3'	

4.3.3.PCR multiplex para identificação das principais espécies

Os isolados confirmados para o gênero foram submetidos ao PCR multiplex para identificação das principais espécies: *A. hydrophila, A. caviae e A. veronii*. O mix da PCR multiplex, com volume total de 25µL, foi constituído de 0,5 µL de amostra de DNA; 12,5µL de master mix (Promega); os volumes dos

oligonucleotídeos (Invitrogen), suas sequências e tamanhos dos produtos estão listadas na Tabela 4. As condições operacionais do termociclador (Applied biosystem;ThermoFisher Scientific) foram as seguintes: etapa inicial de 2 min de a 95 ° C; 50 ciclos de 95 ° C durante 30 s, 64 ° C por 40 s, e 72 ° C por 60 s; e uma etapa final de 72 ° C por 5 min conforme descrito por Persson et al.(2015) com modificações.

Tabela 4. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados na PCR multiplex para identificação das espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii*.

Oligonucleotídeos	**Micro-organismo alvo (gene)**	**Sequência**	**Produto (pb)**	**[ ] do oligonucleotídeo na reação (µM)**
A-cav f	*A. caviae* (*gyrB*)	5'-TGCTGCTGACCATCCGC-3'	70	0,5
A-cav r		5'-GGTGCCTGCGGCTCG-3'		
A-hyd f	*A. hydrophila* (*gyrB*)	5'-AGTCTGCCGCCAGTGGC-3'	144	0,45
A-hyd r		5'-CRCCCATCGCCTGTTCG-3'		
A-ver f	*A. veronii (rpoB)*	5'-CGTGCCGGCTTTGAAGTC-3'	224	0,15
A-ver r		5'-GATCACGTACTTGCCTTCTTCAATA-3'		

Fonte: adaptado PERSSON et al., 2015.

4.3.4. Eletroforese

Todos os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% submerso em tampão 0,5X Tris/Borato/EDTA (TBE). Para realização da corrida das amostras no gel, 8 µL de produto foram misturados a 2 µL de SYBR Safe™(Invitrogren) e aplicados diretamente nos poços do gel, sendo que nos primeiros poços foi colocado o marcador molecular (Sinapse Inc.), de 50bp ou 100bp, de acordo com o tamanho do produto esperado, e, após isso, a cuba de eletroforese (Biorad) foi programada realizar a separação das bandas por 30 minutos. Os resultados foram visualizados com auxílio de transiluminador UV e fotodocumentados (Kodac Gel Logic 200).

4.3.5. Espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo (MALDI-TOF/MS)

Os isolados confirmados para o gênero *Aeromonas* também foram analisados através da técnica de MALDI-TOF/MS para confirmação e comparação com os dados obtidos na identificação por PCR. Esta análise foi realizada em colaboração com o Setor de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Os isolados foram estriados em meio ágar tripticase de soja (TSA) e incubados à 28°C por 24h, para obtenção de colônias isoladas e confirmação da pureza da amostra. Para cada cultura, uma colônia característica foi aplicada, de forma homogênea, em um *spot* da placa do equipamento e em seguida, foi adicionado 1µl de ácido fórmico, e após a secagem, foi adicionado 1µl de matriz de calibração α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, BRUKER). Novamente aguardou-se a secagem e a placa foi lida no equipamento Maldi Biotyper System (MBT MICROFLEX BD BRUKER) utilizando uma faixa de detecção de 2 a 20kDa (PEREZ-SANCHO et al., 2018) em Modo Linear Positivo. Para obtenção dos espectros foi utilizado o software *FlexControl*, os dados foram automaticamente analisados pelo software *FlexAnalysis* e através da biblioteca de dados do equipamento o micro-organismo foi identificado. Segundo critérios de confiabilidade, estipulados pelo próprio fabricante, *scores* ≥2,000 significavam alta taxa de confiança na identificação da espécie; entre 1,999 e 1,800 significavam identificação apenas do gênero e abaixo desse valor, identificação não confiável. Assim, como parâmetro de aceitabilidade, amostras com *score* menor ou igual à 1,7 foram repetidas.

4.4. Determinação do potencial de patogenicidade

A determinação do potencial patogênico dos isolados foi realizada através da detecção dos principais genes codificadores de fatores de virulência. A técnica de PCR foi usada para detecção dos genes codificadores de enterotoxinas citotônicas e citotóxicas *(act*, *alt* e *ast*) conforme previamente descrito por Sen & Rodgers (SEN; RODGERS, 2004) e Carusi (2017); e para os genes codificadores de hemolisinas (*hlyA*) e aerolisina (*aerA*), conforme Heuzenroeder; Wong; Flower (1999) e Carusi (2017).

Assim, a detecção dos genes codificadores das enterotoxinas foi realizado em duas etapas: uma PCR duplex para identificação dos genes *act* e *ast*, e uma PCR comum para o gene *alt* (Tabela 5). O mix do PCR duplex, com volume total de 25µL, foi constituído de 12,5µL de master mix (Promega); 0,2µM de cada oligonucleotídeo (Exxtend); e 1µL de amostra de DNA. Para o PCR comum, o mix, também de 25µL, foi composto de 0,2µM do oligonucleotídeo (Exxtend); 12,5µL de master mix (Promega) e 1µL de amostra de DNA. As condições operacionais do termociclador (Applied biosystem; Thermo Fisher Scientific) foram as seguintes: etapa inicial de 12 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 25s a 95°C, 30s a 55°C e 1 min a 72°C, após finalizados os ciclos, a etapa de extensão final foi de 8 minutos a 72°C.

Tabela 5. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para identificação dos genes codificadores dos fatores de virulência.

Fator de virulência	Gene alvo	Sequência do oligonucleotídeos	Produto (pb)	Referência
Enterotoxina Citotóxica	*act*	F 5’ AGAAGGTGACCACCAAGAACA 3’ R 5’ AACTGACATCGGCCTTGAACTC 3’	232	Sen & Rodgers, 2004.
Enterotoxina citotônica	*ast*	F 5’ TCTCCATGCTTCCCTTCCACT 3’ R 5’ GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG 3’	331	Sen & Rodgers, 2004.
Enterotoxina citotônica	*alt*	F 5’ TGACCCAGTCCTGGCACGGC 3’ R 5’ GGTGATCGATCACCACCAGC 3’	442	Sen & Rodgers, 2004.
Hemolisina	*hlyA*	F 5' GGCCGGTGGCCCGAAGATACGGG 3' R 5' GGCGGCGCCGGACGAGACGGG 3'	597	Heuzenroeder, Wong & Flower, 1999
Aerolisina	*aerA*	F 5' GCCTGAGCGAGAAGGT 3' R 5' CAGTCCCACCCACTTC 3'	416	Heuzenroeder, Wong &Flower, 1999

Para os genes codificadores de hemolisina e aerolisina, cada gene foi analisado separadamente. O mix da PCR, com um volume total de 25µL, foi constituído de 0,2µM de oligonucleotídeo H1 e H2 ou A1 e A2 (cuja sequência pode ser vista na Tabela 5), 12,5µL de master mix (Promega), 0,5µL de amostra de DNA. As condições operacionais do termociclador (Applied biosystem;Thermo Fisher Scientific) foram as seguintes: etapa inicial a 94°C, 40 ciclos de 30s a 94°C, seguido do anelamento de 40s (a 62°C para os ciclos da *hlyA*; e a 52°C para os ciclos da *aerA)* e 1 minuto de extensão a 72°C, após totalizados os ciclos, houve mais 8 minutos de extensão final a 72°C. Para visualização dos produtos da PCR a eletroforese em gel de agarose foi conduzida conforme previamente descrito no item 4.3.4.

4.5. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade das culturas de *Aeromonas* sp. frente aos antimicrobianos escolhidos foi realizada através do método de disco-difusão conforme descrito pelo *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCast, 2017).

A partir do crescimento *overnight* das culturas em meio Ágar nutriente, foi preparada uma suspensão direta das colônias em solução salina [NaCl(Synth) a 0,9%] de modo a obter uma turbidez de 0,5 da escala de McFarland que foi medida pelo equipamento *Densimat* (bioMérieux). Mergulhou-se um suabe estéril na suspensão, removendo o excesso de líquido, pressionando e girando contra a parede do tubo, e inoculando, de forma uniforme, em placa de Ágar Mueller-Hinton (Difco). Com o auxílio de uma pinça estéril foram colocados os antibióticos (Laborclin) e as placas incubadas invertidas a 35°C por 18±2h. Após esse período, foi realizada a medição dos diâmetros dos halos formados (BrCast, 2017) e classificados conforme tabela 6. Para os antimicrobianos cefepima, aztreonam, ciprofloxacino e levofloxacino utilizou-se a tabela do perfil de sensibilidade estabelecido pelo BrCast (2019) para *Aeromonas*; para os antimicrobianos amoxicilina-ácido clavulâmico e imipenem foi utilizada a tabela para *Enterobacterales* do mesmo manual. Para o antimicrobiano tetraciclina foi utilizada a tabela contida no CLSI M100-S29 (2019) para *Enterobacterales*.

Tabela 6. Antibióticos testados e valores de referência para determinação de resistência de *Aeromonas* sp. aos antimicrobianos.

Classe	Antibiótico	Concentração (µg)	Diâmetro do Halo (mm)			Referência
			S≥	I	R<	
Cefalosporinas	Cefepima	30	27	24-26	<24	BrCast (2019)
	Ceftazidima	30	21	18-20	≤17	CLSI (2019)
Monobactâmicos	Aztreonam	30	29	26-28	<26	BrCast (2019)
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	5	27	24-26	<24	
	Levofloxacino	5	27	24-26	<24	
Tetraciclinas	Tetraciclina	30	15	12-14	≤11	CLSI (2019)
Penicilinas	Amoxicilina-Ácido clavulânico	20-10	19	-	<19	BrCast (2019)
Carbapenêmicos	Imipenem	10	22	17-21	<17	

S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente.

4.6 . Análise estatística

Os resultados provenientes das análises foram organizados em bancos de dados por tipo de informação e por grupo de análise e foram criadas as variáveis categóricas de agrupamento necessárias para descrever as medidas coletadas, assim, todas essas informações foram organizadas em um arquivo do software *EXCEL*.

A análise de dados consistiu em realizar a descrição dos dados por meio de informações de média, mediana e desvio padrão para as variáveis quantitativas. Também se apresentou as informações de frequência de resposta, percentagem e prevalência para as variáveis qualitativas. Ainda se aplicou o teste de normalidade de Shapiro Wilk para analisar a adequação a distribuição normal das variáveis quantitativas, e descreveu-se a prevalência de contaminação dos alimentos.

Para a realização das comparações aplicou-se o teste do qui-quadrado para verificar a associação entre genes de virulência e espécies, e entre tipo de peixe e ocorrência. O teste de Wilcoxon foi utilizado na comparação pareada entre

as contagens dos meios AA e SA. O teste de comparação múltipla de Kruskal-Wallis para verificar o potencial de virulência por espécie e também para verificar a associação entre tipo de peixe e valores de contagem.

Ainda se aplicou o Coeficiente de Kappa para analisar a concordância entre meios (SA e AA), entre os métodos de identificação (PCR e MALDI-TOF/MS) e entre as contagens e detecção, a interpretação dos valores de Kappa foi realizada conforme tabela 7.

Tabela 7. Orientação de interpretação dos resultados obtidos nas análises de concordância de Kappa.

Valores de Kappa	Interpretação
<0	Ausência de concordância
0-0,19	Concordância pobre
0,20-0,39	Concordância leve
0,40-0,59	Concordância moderada
0,60-0,79	Concordância substantiva
0,80-1,00	Concordância quase perfeita

Fonte: Silva & Paes, 2012.

Para a análise de dados utilizou-se o *software STATA 12.1.* Foi considerado como nível de significância 5% (p-valor<0,05).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ocorrência e identificação por PCR de *Aeromonas* spp. em alimentos prontos para o consumo

Das 91 amostras avaliadas, foi detectada a ocorrência de *Aeromonas* spp. em 23,08% (21/91) delas, sendo 66,67% nos temaki (20/30), 3,23% (1/31) nas frutas minimamente processadas e em nenhuma (0/30) das amostras de queijo (Tabela 8).

Tabela 8. Ocorrência de *Aeromonas* spp em alimentos prontos para consumo.

Tipo de amostra	Total de amostras analisadas	Número de amostras positivas	Frequência (%)	Prevalência
Temakis	30	20	66,67	0,67
Frutas minimamente processadas	31	1	3,23	0,03
Queijos	30	0	0	0

Este alto índice de amostras positivas em temaki era esperado devido a associação do micro-organismo ao ambiente aquático (IGBINOSA et al., 2012). E também devido ao fato de *Aeromonas* ser relacionada as perdas no setor da aquicultura (NASCIMENTO; ARAÚJO, 2014; TOMÁS, 2012). E está coerente com os achados de Martins (2006) que avaliou a qualidade higiênico-sanitária de sushis e sashimis servidos em bufê na cidade de São Paulo, no período de janeiro a abril de 2004, em 20 estabelecimentos, e constatou a presença do gênero em 75% das amostras (15/20). Um pouco discrepante com Vivekanandhan et al.(2005) que registrou frequência de 33,58% em peixes *in natura* em sua pesquisa realizada na cidade de Coimbatore (Índia), ou até mesmo quando comparamos com dados encontrados por Silva et al.(2010), no Brasil, que verificou a ocorrência de *Aeromonas* em 50% dos peixes frescos analisados comprados no comércio de São Paulo. A explicação do aumento da ocorrência de *Aeromonas* em alimentos prontos para consumo, a base de peixe cru, em relação àquelas encontradas em peixes *in natura* pode ser explicada devido à alta manipulação do produto durante a preparação.

A segurança dos alimentos prontos para consumo depende de diversos fatores tais como matéria-prima de qualidade, caraterísticas do alimento, tecnologia e condições de processamento, armazenamento, embalagem, prazo de validade e contaminação cruzada. Também é fato que o peixe é um ótimo substrato para o crescimento bacteriano, pois há a diminuição do pH e um aumento dos níveis de compostos de nitrogênio após a sua morte e a falta de aquecimento leva a perda de uma importante barreira contra a transferência de micro-organismos patogênicos. Assim, quando a tecnologia de barreira é reduzida há necessidade de práticas de produção ainda mais rigorosas (HOEL; VADSTEIN; JAKOBSEN, 2019).

No presente estudo, foram avaliadas amostras de 13 estabelecimentos (aqui denominados de A à M), em dois estabelecimentos, embora tenhamos analisado 3 amostras, nenhuma delas foi positiva, em 5 estabelecimentos, com mais do que uma amostra coletada, todas as amostras adquiridas foram positivas para o gênero *Aeromonas* (Tabela 9).

Tabela 9. Relação entre a porcentagem de amostras positivas e o estabelecimento de origem da amostra de temaki.

Estabelecimento	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**
Amostras analisadas	1	3	3	2	3	1	3	3	1	3	3	2	2
Amostras positivas	1	0	0	2	3	1	3	2	1	1	2	2	2
Porcentagem	100	0	0	100	100	100	100	66,7	100	33,3	66,7	100	100

Embora este não tenha sido o foco inicial do estudo, esses dados chamaram a atenção pois parece haver uma relação entre as amostras contaminadas e aquelas livres de contaminação com os estabelecimentos nas quais foram adquiridas. Não foi possível fazer uma análise estatística de concordância entre esses dados, pela quantidade de amostras analisadas por estabelecimento e por haver categorias zeradas, o que fere o pressuposto do teste. Porém podemos levantar a hipótese de que esses resultados podem indicar possível falta de cuidados durante o preparo do alimento e consequente contaminação cruzada. Prado et al. (2014) realizaram um estudo para avaliação dos pontos críticos na qualidade higiênico-sanitária no preparo de *sushi* e *sashimi*, na cidade de São

Vicente, São Paulo, durante o mês de fevereiro de 2007. Os autores apontaram o pescado cru como o maior motivo de preocupação, pelo fato deste não passar por nenhuma etapa de eliminação de contaminantes microbiológicos, e foram identificados diversos pontos críticos que devem ser considerados durante toda a cadeia produtiva: na etapa de recepção do pescado deve ser observada as características organolépticas do mesmo e mantida temperatura entre 2° e 3°C, essa mesma temperatura deve ser controlada durante o armazenamento (de até 3 dias) do produto. O pré-preparo deve ser feito em pequenos lotes que podem ser trabalhados por no máximo 30 minutos, o manipulador deve realizar correta assepsia das mãos e higienizar corretamente equipamentos e utensílios, os mesmos cuidados devem ser repetidos para a etapa de montagem dos produtos e para a distribuição, ele deve novamente ser armazenado sob refrigeração de 10°C até 4 horas ou entre 10° e 21°C por até 2 horas. Para correta execução de todas as etapas, é necessário o treinamento dos manipuladores. Todos esses pontos acima discriminados também servem para a preparação do temaki, e caso alguma dessas etapas citadas não sejam cumpridas, isso pode refletir na qualidade microbiológica dos temakis preparados, gerando contaminação cruzada, seja entre ambiente, manipulador e matéria-prima. Isso explicaria o fato de 5 estabelecimentos analisados terem todas as amostras analisadas positivas para o gênero.

Dos tipos de temaki a maior frequência de amostras positivas foi de 77,8% (7/9) encontrada nos temakis de peixe branco, seguido de 62,5% (5/8) nos temakis de atum e 61,5% (8/13) nos temakis de salmão. Os temakis de peixe branco eram principalmente de tilápia (8/9), sendo somente um de peixe agulhão. Não foi encontrada relação de maior ocorrência de *Aeromonas* sp. associada a um tipo específico de peixe dentre os temakis estudados (Apêndice C), visto que nas análises de qui-quadrado realizadas nos resultados de contagens e detecção, em ambos os meios de cultura, não apresentaram diferença ($p>0,05$). Na contagem em AA, o p-valor não pode ser encontrado, devido à ausência de resultados positivos para a amostra de atum.

A associação entre o tipo de peixe e a contagem de *Aeromonas* presente, determinadas pelos meios AA e AS, foi verificada pelo teste de comparação múltipla de Kruskal-Wallis. O teste não demonstrou associação ($p > 0,05$) (Apêndice D).

O gênero *Aeromonas* foi dividido em dois grupos: as psicrofílicas imóveis, que infectam peixes e répteis e as mesófilas móveis, que infectam humanos

(BERGEY; HOLT, 1993; JANDA; ABBOTT, 2010), porém segundo a literatura, *Aeromonas* mesofílicas (*A.hydrophila* e *A.veronii*) causam doenças em peixes como carpa, tilápia, poleiro, peixe gato e salmão (TOMÁS, 2012). Assim como também há registros de casos de *Aeromonas* psicrofílicas infectando humanos (FERNÁNDEZ-BRAVO; FIGUERAS, 2020; NOJIMOTO et al., 1997). Logo, podemos inferir que embora exista essa divisão em grupos dentro do gênero, na prática, esse enquadramento não acontece, e assim *Aeromonas* mesofílicas infectam peixes e *Aeromonas* psicrofílicas podem infectar humanos. *Aeromonas* encontradas na aquicultura são uma fonte de contaminação do alimento proveniente da mesma. O que torna o controle desse ambiente muito importante, especialmente para alimentos que não passarão por nenhum tratamento térmico, como, por exemplo, os temakis. Mas apesar dessa relação já conhecida de *Aeromonas* com a água e com a incidência desse patógeno na aquicultura, não há menção sobre a verificação desse patógeno em alimentos prontos para consumo de origem animal elaborados sem o emprego de calor e consumidos crus, nem na legislação passada, nem atual (Anexos A e B).

Existem poucos trabalhos relacionados a prevalência de *Aeromonas* em frutas, e não foram encontrados trabalhos em frutas minimamente processadas. Porém, uma amostra de melão positiva, que representou 3,23% das amostras, na qual foram identificadas, por PCR, *A. hydrophila* positivas para quatro genes de virulência pesquisados, mostrando que é um alimento merecedor de mais estudos devido ao potencial patogênico encontrado. Segundo Stratev & Odeyemi (2015), os vegetais podem estar contaminados com diferentes tipos de micro-organismos, e vários fatores contribuem para isso: podem ser provenientes do ambiente, do processamento, do tempo e das condições de estocagem. A falta de condições higiênicas durante o processamento e o fato destes alimentos não passarem por processos térmicos contribuem para a disseminação de micro-organismos, entre eles *Aeromonas*. Aplicando esses mesmos conceitos para as frutas minimamente processadas, a carga microbiana inicial, assim como as condições de manipulação do alimento e a ubiquidade do micro-organismo aliado ao fato de ser um produto já pronto para o consumo, podem disseminar *Aeromonas,* assim representam potencial risco à saúde.

Não foi encontrado nenhuma amostra positiva para os queijos testados, esse resultado é um pouco divergente da literatura. No Brasil, Freitas et al. (1993)

encontraram frequência de 33% (8/25) de *Aeromonas* em amostras de queijo. Bulhões & Rossi (2002) encontraram uma frequência ainda maior, de 51,2%, em amostras de "queijo de Minas" artesanal; e Araújo et al. (2002) avaliaram 45 amostras de 3 marcas diferentes, e encontraram as seguintes prevalências: 13,3% (2/15) na marca A, 33,3% (5/15) na marca B e 6,06% (1/15) na marca C. Carneiro & Rossi Jr (2006) avaliaram a prevalência de *Aeromonas* ao longo da cadeia produtiva de beneficiamento de leite de uma granja, neste estudo constatou-se que no leite cru a prevalência era de 90% e no produto final (leite pasteurizado embalado) 25%, uma frequência variante foi constatada nas etapas intermediárias, para as variações discrepantes durante a cadeia de processamento foi atribuído falhas no processo.

Todos esses resultados acima têm pontos em comum que dizem muito sobre a prevalência de *Aeromonas* em queijos: esse micro-organismo é encontrado no leite cru, e no decorrer no processamento ele é eliminado pelo processo de pasteurização. Isso explica os resultados de Freitas et al. (1993) e Araújo et al. (2002) uma vez que o processamento e a legislação se tornaram mais rígidos, com a implementação da pasteurização em lacticínios (SILVA; SILVA; FERREIRA, 2012) e a exigência cada vez maior, do mercado, da aplicação de boas práticas de fabricação (BPF). Fica evidente que a cadeia produtiva interfere no processo, uma vez que Araújo et al. (2002) encontraram incidências dispares para diferentes marcas de queijos. O índice ainda maior encontrado por Bulhões & Rossi (2002) pode ser explicado por ser um produto artesanal. E fica bastante evidente quando olhamos para os estudos de Carneiro & Rossi Jr (2006), de Yucel et al. (2005) e Melas et al. (1999), pois em todos estes, as contagens encontradas no leite cru são consideravelmente maiores do que no produto final, inclusive Yucel et al. (2005) atribuíram o próprio resultado nos produtos finais a contaminações pós-processamento oriundas de ambiente ou manipuladores.

Diante das evidências encontradas na literatura, não ter encontrado *Aeromonas* nos queijos deste estudo pode ser atribuído ao fato de todas as amostras testadas serem provenientes de indústrias, as quais atualmente possuem maior exigências sanitárias do que no passado, sendo obrigatória a pasteurização do leite antes de sua transformação em queijo.

Altas contagens de *Aeromonas* sp. foram observadas nas amostras de temaki. As contagens variaram de menor do que $1,0x10^2$ a $2,64x10^5 UFC.g^{-1}$, para os temakis e variou de $1,16x10^2$a $2,88x10^2$ $UFC.g^{-1}$para uma amostra de melão (Tabela

10). Um total de 10 amostras positivas, todas de temaki, apresentaram contagem abaixo do valor do limite de detecção (<1,0x10^{2}UFC.g^{-1}).

Tabela 10. Detecção e Contagem de *Aeromonas* sp. em meio Ágar *Aeromonas* e Ágar Amido Ampicilina para amostras positivas de temaki e frutas minimamente processadas (melão).

Amostra	Tipo de amostra	Contagem (UFC.g^{-1})		Detecção	
		Ágar *Aeromonas*	Ágar Amido Ampicilina	Ágar *Aeromonas*	Ágar Amido Ampicilina
46	Temaki de Salmão	<1,0x10^2	3,3x10^3	-	+
53	Temaki de Tilápia	<1,0x10^2	3,1x10^4	-	-
54	Temaki de Salmão	<1,0x10^2	3,5x10^3	-	-
59	Melão	1,2x10^2	2,9x10^2	+	+
61	Temaki de Salmão	<1,0x10^2	<1,0x10^2	+	+
62	Temaki de Atum	<1,0x10^2	<1,0x10^2	-	+
63	Temaki de Tilápia	9,6x10^4	1,0x10^5	+	+
64	Temaki de Salmão	<1,0x10^2	<1,0x10^2	-	+
65	Temaki de Salmão	6,8x10^3	1,1x10^4	-	+
66	Temaki de Atum	<1,0x10^2	<1,0x10^2	-	+
67	Temaki de Tilápia	<1,0x10^2	<1,0x10^2	-	+
69	Temaki de Atum	<1,0x10^2	<1,0x10^2	-	+
70	Temaki de Tilápia	<1,0x10^2	<1,0x10^2	+	+
81	Temaki de Salmão	<1,0x10^2	1,4x10^3	+	+
84	Temaki de Tilápia	<1,0x10^2	<1,0x10^2	+	+
86	Temaki de Atum	<1,0x10^2	1,6x10^4	-	+
87	Temaki de Tilápia	1,0x10^4	1,4x10^5	+	-
88	Temaki de Salmão	1,7x10^4	2,6x10^5	+	-
89	Temaki de Tilápia	<1,0x10^2	6,7x10^4	+	-
90	Temaki de Salmão	<1,0x10^2	<1,0x10^2	+	-
91	Temaki de Atum	<1,0x10^2	<1,0x10^2	+	+

Para detecção e contagem foram escolhidos dois meios de cultura: o ágar amido ampicilina , indicado pelo *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* da *American Public Health Association;* e o ágar *Aeromonas,*

devido ao fato deste meio ter apresentado melhor desempenho entre os meios pesquisados por Rodrigues (2007) em sua pesquisa por *Aeromonas* spp. em tilápias; e também por ter sido o meio indicado por Andelová et al. (2006) no isolamento de *Aeromonas* em amostras de fezes de pacientes com gastroenterites. Para avaliar o desempenho dos dois meios de cultura foi realizada análise estatística dos resultados, primeiramente foi verificada a concordância da detecção e contagens em cada meio de cultura, uma vez que tivemos resultados falsos negativos na detecção e assim era necessária checar a coerência desses resultados. Para isso, utilizamos a análise de concordância de Kappa, que determinou que ambos os meios de cultura tiveram desempenho satisfatório ($p < 0,05$), sendo a interpretação do índice de concordância, dentro da classificação de Kappa, para o meio *Aeromonas* (Tabela 11) foi um pouco maior do que para o meio ágar amido ampicilina (Tabela 12), sendo a primeira “moderada” e a segunda “leve”, desta forma, ambos os meios podem ser utilizados. Dentro desse resultado, podemos ressaltar essa maior associação ao meio ágar *Aeromonas* ao verificar o que número de falsos negativos na detecção foi menor neste meio do que no ágar amido ampicilina.

Tabela 11. Análise de Kappa para verificar a concordância entre detecção e contagem no meio de cultura ágar *Aeromonas* (AA).

	Detecção AA				
Contagem AA	**Ausente**	**Presente**	**Total**	**Kappa**	**p-valor**
Ausente	79	7	86	**0,459**	**<0,01***
Presente	1	4	5		
Total	80	11	91		

Tabela 12. Análise de Kappa para verificar a concordância entre detecção e contagem no meio de cultura ágar amido ampicilina (SA).

	Detecção SA				
Contagem SA	**Ausente**	**Presente**	**Total**	**Kappa**	**p-valor**
Ausente	71	9	80	**0,374**	**<0,01***
Presente	5	6	11		
Total	76	15	91		

Assim, analisamos a coerência entre contagem e detecção dos meios por categoria de alimentos. Sendo possível notar que tanto o ágar *Aeromonas* (Tabela 13) quanto o ágar amido ampicilina (Tabela 14) apresentaram concordância total

(Kappa perfeito = 1) na categoria frutas, e, também em ambos os casos, apresentaram Kappa sem concordância na categoria temaki, que pode ter sido ocasionada pelos resultados falsos negativos na detecção. As contagens na categoria temaki foram maiores do que na categoria frutas, o que pode justificar essa discordância, como discutiremos adiante.

Tabela 13. Análise de Kappa para verificar a concordância entre contagem e detecção no meio de cultura ágar *Aeromonas* (AA) por categoria de alimentos.

Amostra	Detecção AA				
	Ausente	Presente	Total	Kappa	p-valor
Queijo				-	-
Contagem AA					
Ausente	30	0	30		
Presente	0	0	0		
Total	30	0	30		
Frutas				1,00	<0,01*
Contagem AA					
Ausente	30	0	30		
Presente	0	1	1		
Total	30	1	31		
Temaki				0,294	0,058
Contagem AA					
Ausente	19	7	26		
Presente	1	3	4		
Total	20	10	30		

Tabela 14. Análise de Kappa para verificar a concordância entre contagem e detecção no meio de cultura ágar amido ampicilina (SA) por categoria de alimentos.

Amostra	Detecção SA				
	Ausente	Presente	Total	Kappa	p-valor
Queijo				-	-
Contagem SA					
Ausente	30	0	30		
Presente	0	0	0		
Total	30	0	30		
Frutas				1,00	<0,01*
Contagem SA					
Ausente	30	0	30		
Presente	0	1	1		
Total	30	1	31		
Temaki				0,045	0,796
Contagem SA					
Ausente	11	9	20		
Presente	5	5	10		
Total	16	14	30		

Também foi comparado o desempenho entre os meios, primeiramente analisando se os resultados observamos concordância entre si na detecção do micro-organismos, através do teste de concordância de Kappa (Tabela 15). Foi concluído que os métodos eram correspondentes, com $p < 0,05$ e Kappa = 0,464 (concordância moderada). Observando maior ocorrência de resultados positivos em meio SA (8) que não foram detectados em AA; do que resultados positivos em meio AA (4) que não foram detectados em SA, o que aponta maior eficiência de SA.

Tabela 15. Análise de Kappa para verificar concordância entre os meios de cultura AA e SA na detecção de *Aeromonas* spp.

	Detecção SA				
Detecção AA	**Ausente**	**Presente**	**Total**	**Kappa**	**p-valor**
Ausente	72	8	80	**0,464**	**<0,01***
Presente	4	7	11		
Total	76	15	91		

SA=ágar amido ampicilina; AA=ágar *Aeromonas*

De modo geral, quando analisados separadamente, os dois meios de cultura foram considerados satisfatórios para a detecção e contagem de *Aeromonas* spp., sendo que ambos apresentaram falhas em um mesmo ponto: apresentação de falsos negativos na detecção. No AA as falhas foram menores que em SA, porém quando analisadas o número de detecção apontadas por um meio e ausente em outro, observamos que SA foi melhor do que AA Quanto aos resultados falsos negativos apresentados na detecção, Robinson et al. (1986) publicaram um estudo comparativo entre o plaqueamento direto e o uso de meio de enriquecimento para o isolamento de *Aeromonas* spp. de fezes, e concluíram que o enriquecimento era útil em pacientes convalescentes e assintomáticos ou com sintomas leves, porém seu uso não é recomendado para pacientes com diarreia aguda. Da mesma forma, se analisarmos os resultados falsos negativos na detecção, podemos perceber que estão associados a altas contagens, sendo assim, da mesma forma, podemos inferir a não recomendação do uso do enriquecimento para a detecção de *Aeromonas* spp. em alimentos com alto índice de contaminação por este micro-organismo.

Também foi comparada a contagem obtida em cada meio de cultura através de comparação pareada, neste ponto, os meios de cultura foram divergentes ($p = 0,003$), sendo que no ágar SA obteve-se contagens maiores que no AA (Tabela

16), demonstrando sua maior efetividade. Uma hipótese para explicar essa maior sensibilidade de SA em relação a AA pode ser atribuída ao fato do primeiro possuir o dobro de ampicilina do que o segundo, assim pode inibir com maior eficiência a microbiota competitiva, aumentando as taxas de recuperação do micro-organismo alvo.

Tabela 16. Comparação pareada, através do teste de Wilcoxon, entre as contagens de *Aeromonas* spp. obtidas em meio ágar *Aeromonas* (AA) e ágar amido ampicilina (SA).

	Mínimo	**Média**	**DP**	**Mediana**	**Máximo**	**p-valor**
Meios						**0,003***
Contagem AA	0	1428	10255	0	96000	
Contagem SA	0	5419	29949	0	260000	

Por fim, ambos os meios são eficientes para a detecção e contagem de *Aeromonas* spp., pois concordaram de forma moderada. Para alimentos altamente associados aos micro-organismo recomenda-se a detecção direta associada a detecção com etapa de enriquecimento, para evitar falsos negativos, especialmente em SA, uma vez que demonstrou ser mais eficiente que AA, o que justifica sua recomendação no *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* da *American Public Health Association,* embora AA também seja um meio válido para a detecção do micro-organismo em alimentos.

Para avaliar enteropatogenicidade da *Aeromonas*, Teunisand Figueira (2016) fizeram um estudo composto de testes de desafio, no qual 57 voluntários ingeriram doses do micro-organismo, que resultou em infecções assintomáticas em 15 pessoas e sintomas entéricos agudos em apenas 2 voluntários. Estes resultados foram comparados a dados de infecções naturais, que mostraram que o risco de infecção por exposição à *Aeromonas,* nos casos naturais era mais alto do que o risco de infecção nos testes desafio, sendo a dose infectante em infecções naturais de 0,9 UFC e de $1{,}24 \times 10^4$ UFC nos testes de desafio (TEUNIS; FIGUERAS, 2016). Podemos observar, desta forma, a característica oportunista do micro-organismo.

Assim, é aceito que existe uma dose infectante, ou seja, é necessário um número “n” de *Aeromonas* para causar gastroenterites em humanos, porém já está consolidado que o processo de infecção é complexo e multifatorial, envolvendo não

somente os fatores de virulência das cepas, mas também sua interação com a microbiota do hospedeiro, com patógenos presentes na co-infecção, com micro-organismo do ambiente e também dependente da condição fisiológica do infectado (TEUNIS; FIGUERAS, 2016). Portanto, considerando a dose infectante acima de 10 UFC (PARKER; SHAW, 2010), 11 das amostras testadas apresentaram contagens acima do valor designado, apresentando potencial risco, sendo 10 delas de temaki e uma de melão. Porém, com todo o conhecimento da complexidade do processo de infecção, não podemos descartar que a presença de *Aeromonas* pode ser um risco dependendo do consumidor do produto.

Das espécies encontradas, segundo a identificação feita através do PCR multiplex, no qual foi analisado a presença das espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii*, foi constatada a prevalência de outras espécies, que neste momento foram classificadas como *Aeromonas* sp. Se analisada a distribuição das espécies sem diferenciarmos as amostras, verificamos a ocorrência de *Aeromonas* sp. em 44,44% dos isolados, seguida de *A. caviae* (26,39%), *A. hydrophila* (20,83%) e *A. veronii* (8,34%). Na distribuição de espécies por tipo de amostra, foi mantida a prevalência de *Aeromonas* sp. com 41,54% em amostras de temaki e 71,43% em amostra de frutas minimamente processadas. *A.caviae* foi encontrada somente em temakis (29,23%), *A. hydrophila* foi identificada em ambos os tipos, sendo 20% das espécies isoladas em temaki e 28,57% das encontradas em frutas minimamente processadas. *A.veronii* foi identificada em 9,23% dos isolados de temaki e não foi identificada nas amostras de frutas (Figura 3).

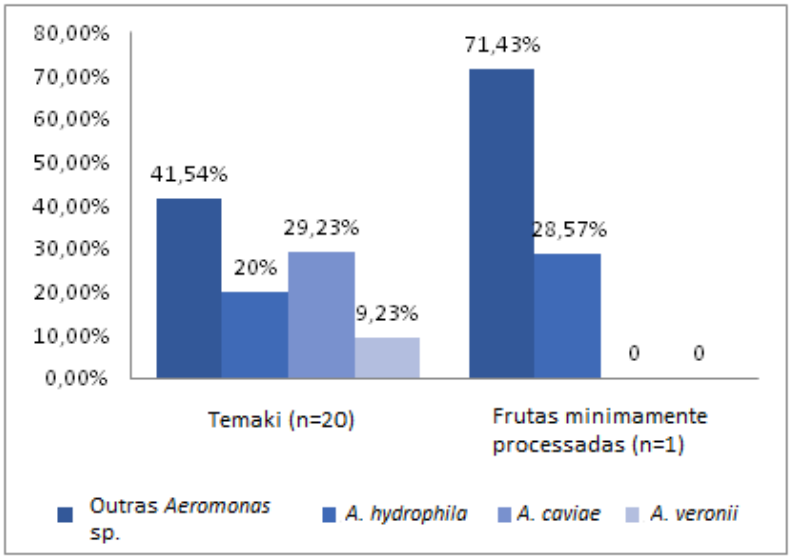

Figura 3. Distribuição das espécies de *Aeromonas* sp. por grupo de amostras.

No presente trabalho, em uma pequena parcela das amostras, observamos que a distribuição das espécies aconteceu de forma heterogênea, ou seja, mais de uma espécie foi encontrada. Mosser et al. (2015) estudaram a influência da infecção por pares de cepas de *Aeromonas* no modelo *Caenorhabditis elegans*, e descobriram um efeito sinérgico de virulência em co-infecções de cepas de espécies diferentes de *Aeromonas*.

5.2. Identificação dos isolados através de MALDI-TOF/MS

Sessenta isolados foram submetidos a análise por MALDI-TOF/MS. Todos os isolados foram confirmados para o gênero. Para identificação da espécie, foi considerado o resultado com o maior score, acima de 2,000. Os resultados dessa análise foram comparados com os obtidos no PCR de identificação das espécies *A.hydrophila*, *A.veronii* e *A.caviae*. A identificação dessas espécies, em porcentagem, teve altos índices de concordância, sendo a maior para *A. caviae* com correspondência de 92,86% (13/14) dos isolados, seguida de *A. hydrophila* com 84,62% (11/13) e de *A. veronii* com 83,33% (5/6).

Para comparar a eficiência dos métodos analisados foi aplicado o teste de concordância de Kappa (Tabela 17), no qual o p-valor referente ao teste de significância do coeficiente de Kappa foi significativo (<0,01) e o valor de Kappa (0,718) correspondeu a substantiva, o que significa que os métodos são correspondentes.

Tabela 17. Teste de Kappa para verificar a concordância entre os métodos de identificação PCR e MALDI-TOF/MS.

	PCR						
	A. caviae	***A. hydrophila***	***A. veronii***	**outras *Aeromonas***	**Total**	**Kappa**	**p-valor**
MALDI-TOF/ MS						**0,718**	**<0,01***
A. caviae	13	0	0	0	13		
A. hydrophila	0	11	0	3	14		
A. veronii	0	0	5	5	10		
Outras *Aeromonas*	1	2	1	19	23		
Total	14	13	6	27	60		

Como a PCR foi realizada somente para as espécies *A. caviae*, *A. hydrophila* e *A. veronii*, não podemos inferir nenhum tipo de concordância para as outras espécies de *Aeromonas* identificadas pelo MALDI-TOF/MS, que foram: *A. bestiarum* (6), *A. encheleia* (1), *A. eucrenophila* (15), *A. salmonicida* (1). Houve discrepância na identificação, conforme Tabela 18, contudo, conforme citado acima, podemos afirmar que esta discrepância não foi significativa devido ao resultado obtido na análise de concordância de Kappa.

Tabela 18. Descrição das espécies identificadas por PCR e MALDI-TOF/MS e a associação entre esses resultados.

	PCR							
	A. caviae		***A. hydrophila***		***A. veronii***		**outras *Aeromonas***	
MALDI-TOF/MS	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**
A. caviae	13	92,9%	0	0%	0	0%	0	0%
A. hydrophila	0	0%	11	84,6%	0	0%	3	11,1%
A. veronii	0	0%	0	0%	5	83,3%	5	18,5%
A. bestiarum	0	0%	2	15,4%	0	0%	4	14,8%
A. encheleia	0	0%	0	0%	0	0%	1	3,7%
A. eucrenophila	1	7,1%	0	0%	0	0%	14	51,9%
A. salmonicida	0	0%	0	0%	1	16,7%	0	0%

Esses resultados estão de acordo com estudos de isolados clínicos realizados por Porte et al.(2017) e Shin et al. (2015), e com estudos de amostras de alimentos e ambientais realizados por Lamy et al. (2011) e Elbehiry et al. (2018), que afirmaram a eficiência da técnica para a detecção de *Aeromonas*, mesmo divergindo em termos de metodologia, uma vez que neste trabalho não foi realizada a etapa de extração de proteínas com etanol e ácido fórmico, sendo utilizado apenas esse último, que se mostrou igualmente eficaz. Assim, esses resultados garantem MALDI-TOF/MS como uma ferramenta prática na identificação dos principais isolados de importância médica do gênero *Aeromonas*, podendo a cultura ser examinada diretamente, sem necessidade de complexos processos de extração.

5.3. Perfil de virulência dos isolados

Todos os 72 isolados provenientes de 21 amostras, foram pesquisados 5 genes de virulência: *aerA*, codificador da aerolisina; *hlyA*, codificador da hemolisina HlyA; e *act*, *alt* e *ast* codificadores, respectivamente, das enterotoxinas Act, Alt e Ast.

O perfil genotípico dos fatores de virulência apresentou-se bastante variável, até mesmo para isolados de uma mesma amostra, de maneira geral, e de forma independente, o gene que apresentou maior frequência foi o gene *aerA* ocorrendo em 47,2% (34/72) dos isolados, seguido do gene *act* em 41,7% (30/72), os genes *hlyA* e *alt* em 38,9% (28/72) e o gene de menor presença foi o gene *ast* com 18,1% (13/72) (figura 4).

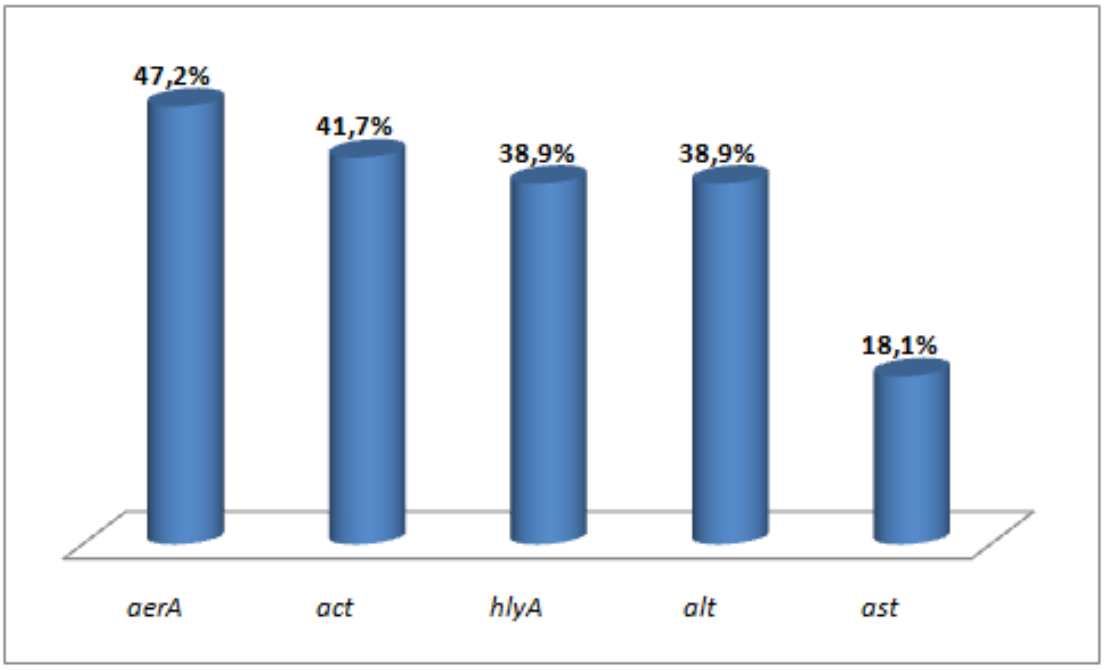

Figura 4. Prevalência dos genes de virulência (*act*, *alt*, *ast, aerA* e *hlyA)* nos isolados.

Quando analisamos os genes de forma conjunta, verificamos que em 59,72% (43/72) dos isolados apresentaram de 1 a 5 dos fatores de virulência que foram pesquisados. Não foram encontrados genes de virulência em 29 isolados (40,28%) provenientes de espécies variadas, predominantemente em *A. caviae*. Em 6 isolados (8,37%) apresentou-se a ocorrência de todos os genes pesquisados, eles foram provenientes das amostras 63 e 87, ambas temaki de Tilápia, e foram identificados como *A. hydrophila*. Em 16,67% (12/72) detectou-se simultaneamente 4 genes, em 15,28% (11/72) apresentou-se 3 fatores de virulência, em 11,12% (8/72) foram 2 genes e em 8,37% (6/72) foi registrado apenas um fator pesquisado como descrito na Tabela 19.

Tabela 19. Frequência, total e por categoria de alimento, dos perfis de virulência identificados nos isolados.

Perfil	Genes	Frequência total		Frequência melão		Frequência temaki	
		Freq.	%	Freq.	%	Freq.	%
1	**nenhum**	29	40,28	2	28,57	27	41,54
2	***alt***	2	2,78	1	14,29	1	1,54
3	***act***	1	1,39	0	0	1	1,54
4	***aerA***	3	4,17	0	0	3	4,62
5	***ast, hlyA***	1	1,39	0	0	1	1,54
6	***act, aerA***	3	4,17	0	0	3	4,62
7	***alt, act***	1	1,39	0	0	1	1,54
8	***aerA, hlyA***	1	1,39	0	0	1	1,54
9	***alt, aerA***	1	1,39	0	0	1	1,54
10	***ast, act***	1	1,39	0	0	1	1,54
11	***alt, act, aerA***	3	4,17	0	0	3	4,62
12	***act, aerA, hlyA***	5	6,94	0	0	5	7,69
13	***alt, ast, hlyA***	2	2,78	0	0	2	3,08
14	***alt, act, hlyA***	1	1,39	4	57,15	1	1,54
15	***alt, act, aerA, hlyA***	9	12,50	0	0	5	7,69
16	***alt, ast, aerA, hlyA***	3	4,17	0	0	3	4,62
17	***alt, ast, act, aerA, hlyA***	6	8,33	0	0	6	9,23
	Subtotal 1	29	40,28	2	28,57	27	41,54
	Subtotal 2	43	59,72	5	71,43	38	58,46
	Total	72	100	7	100	65	100

Subtotal 1: isolados que não apresentaram genes de virulência; **Subtotal 2:** isolados que apresentaram de 1 a 5 genes de virulência.

Os 17 perfis de virulência encontrados entre os isolados (Tabela 19) foram analisados estatisticamente através do teste de associação qui-quadrado (Tabela 20). Esta análise apresentou associação entre o aparecimento dos genes *alt*, *act* e *aerA* com a espécie ($p<0,05$), sendo que nos três casos *A. hydrophila* foi a espécie mais associada a esses genes. Pelo total de genes presentes, *A. hydrophila* apresentou maior porcentagem de presença com 93,3%.

Tabela 20 . Teste do qui-quadrado para verificar a associação dos genes *alt*, *ast*, *act*, *aerA* e *hlyA* com a espécie de *Aeromonas* pesquisadas.

	Espécie								
	A. caviae		***A. hydrophila***		***A. veronii***		**outras *Aeromonas* sp.**		
Gene	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**p-valor**
alt									**0,001***
Ausente	18	94,7	4	26,7	3	50	19	59,4	
Presente	1	5,3	11	73,3	3	50	13	40,6	
ast									-
Ausente	18	94,7	6	40	6	100	29	90,6	
Presente	1	5,3	9	60	0	0	3	9,4	
act									**0,002***
Ausente	18	94,7	5	33,3	3	50	16	50	
Presente	1	5,3	10	66,7	3	50	16	50	
aerA									**0,001***
Ausente	17	89,5	3	20	3	50	15	46,9	
Presente	2	10,5	12	80	3	50	17	53,1	
hlyA									-
Ausente	19	100	3	20	5	83,3	17	53,1	
Presente	0	0	12	80	1	16,7	15	46,9	
TOTAL									
Ausente	16	84,2	1	6,7	2	33,3	10	31,3	
Presente	3	15,8	14	93,3	4	66,7	22	68,8	

Uma associação significativa (p <0,001) entre o total de genes de virulência com a espécie foi observada através da comparação múltipla de Kruskal Wallis (Apêndice E). *A. hydrophila* é a mais virulenta, seguida de outras *Aeromonas* sp. e *A. veronii*, sendo *A. caviae* a espécie com menor número de dos genes pesquisados.

Wong et al. (1998) demonstraram em seu estudo que a associação dos genes "*hlyA* + *aerA*" estão envolvidos no papel da virulência, sendo genes associados à diarreia em *A. hydrophila* e *A. veronii*. Tal associação de genes foi encontrada em nosso estudo, de forma exclusiva em isolados de 1 isolado proveniente de temaki, e de forma associativa em 23 isolados, sendo as associações *act*, *aerA, hlyA* (5); *alt, act, aerA, hlyA* (9); *alt, ast, aerA, hlyA* (3); *alt, ast, act, aerA, hlyA* (6) provenientes de amostras de temaki e melão (Tabela 19).

Albert et al. (2000) fizeram um estudo comparativo da prevalência dos genes das enterotoxinas *act*, *alt* e *ast* em *Aeromonas* spp. isoladas de crianças com diarreia (125 isolados), de um grupo de crianças saudáveis (27 isolados) e de amostras de ambiente (120 isolados), no qual foi constatado uma alta taxa de associação dos genes *alt* e *ast* em pacientes com diarreia, sugerindo um efeito sinérgico na associação destes genes, levando a uma diarreia mais grave. Segundo os autores, não foi encontrada a presença do gene *act* nas crianças com quadro de diarreia. Em nosso estudo, tal associação (*alt*+*ast*) não foi encontrada de forma absoluta, mas foi encontrada em 11 isolados, acompanhada de outros genes de virulência: em 2 isolados, como *alt, ast, hlyA*; em 3 como *alt, ast, aerA, hlyA*; e em 6 acompanhados de todos os genes pesquisados (Tabela 19).

Outro estudo envolvendo as enterotoxinas Act, Alt e Ast demonstrou que todas elas têm um papel no processo de gastroenterite. Casos de diarreia ocasionadas por *Aeromonas* pode conter um, dois ou três das enterotoxinas, embora a maioria apresente de 2 a 3 genes em combinações variadas. A contribuição de cada enterotoxina na produção de secreção fluida foi de 64%, 48% e 43%, respectivamente para os genes *act, alt* e *ast*. O gene *act* está associado a presença de sangue nas fezes (SHA; KOZLOVA; CHOPRA, 2002). Em nosso estudo, em 13 isolados os genes *act*, *alt* e *ast* apareceram sozinhos, ou na presença de outro gene; em 14 isolados houve associação de *alt* e *act*; em 5 houve associação entre *alt* e *ast*; em 1 de *ast* e *act* e em 6 ocorreu associação dos 3 genes (Tabela 19).

Uma análise do perfil de virulência associado à amostra e à espécie foi realizada (Tabela 21). Das 21 amostras positivas, 7 apresentaram ausência dos genes de virulência (perfil 1) pesquisados enquanto em duas amostras de temaki foram identificados isolados que apresentaram todos os genes de virulência pesquisados (perfil 17), sendo que, em ambas, os isolados eram da espécie *A. hydrophila*. Utilizando os dados de especiação encontrados através da técnica de PCR, em 7 das amostras identificamos apenas uma espécie (*A. hydrophila*, *A. caviae* ou *A. veronii*), em 6 amostras foram identificadas apenas *Aeromonas* sp. e em 8 amostras foram identificadas a co-existência de mais de uma espécie do gênero.

Tabela 21. Perfil de virulência associado à amostra, à espécie e ao estabelecimento de origem da amostra.

Amostra	Tipo	Origem	Espécie	Perfil de virulência*
46	Temaki	Estabelecimento A	*A. caviae*	1 e 4
53	Temaki	Estabelecimento D	*Aeromonas* sp.	1
54	Temaki	Estabelecimento D	*A. caviae*	1
59	Melão	Varejão	*A. hydrophila*	15
			Aeromonas sp.	1, 2 e 15
61	Temaki	Estabelecimento E	*A. caviae*	1
62	Temaki	Estabelecimento E	*A. hydrophila*	3
63	Temaki	Estabelecimento E	*A. hydrophila*	4, 5 e 17
			A. veronii	6 e 11
64	Temaki	Estabelecimento F	*Aeromonas* sp.	1
65	Temaki	Estabelecimento G	*A. caviae*	1
			Aeromonas sp.	1
			A. veronii	1
66	Temaki	Estabelecimento G	*Aeromonas* sp.	7
67	Temaki	Estabelecimento G	*A. hydrophila*	1
			Aeromonas sp.	1
69	Temaki	Estabelecimento H	*Aeromonas* sp.	8
70	Temaki	Estabelecimento H	*A. caviae*	9
			Aeromonas sp.	1, 4 e 12
81	Temaki	Estabelecimento I	*A. hydrophila*	16
			Aeromonas sp.	1 e 16
			A. veronii	2 e 15
84	Temaki	Estabelecimento J	*Aeromonas* sp.	12 e 15
86	Temaki	Estabelecimento K	*Aeromonas* sp.	13
			A. veronii	1
87	Temaki	Estabelecimento K	*A. hydrophila*	16 e 17
			Aeromonas sp.	1, 6 e 11
88	Temaki	Estabelecimento L	*A. caviae*	1
89	Temaki	Estabelecimento L	*A. caviae*	1 e 10
90	Temaki	Estabelecimento M	*A. hydrophila*	15
91	Temaki	Estabelecimento M	*Aeromonas* sp.	12 e 14

* **Perfil de virulência: 1-**nenhum gene pesquisado; **2-** *alt*; **3-** *act*; **4-** *aerA*; **5-** *ast, hlyA;* **6-** *act, aerA;* **7-** *alt, act;* **8-** *aerA, hlyA;* **9-** *alt, aerA;* **10-** *ast, act;* **11-** *alt, act, aerA;* **12-** *act, aerA, hlyA;* **13-** *alt, ast,hlyA;* **14-** *alt, act, hlyA;* **15-** *alt, act, aerA, hlyA;***16-** *alt, ast, aerA, hlyA;* **17-** todos os genes pesquisados.

Referente as amostras positivas de um mesmo estabelecimento, em um caso encontrado (estabelecimento L) a mesma espécie com o mesmo perfil de virulência, o que poderia indicar contaminação cruzada, quando, por exemplo, um utensílio utilizado em um alimento contaminado é utilizado em um não contaminado, o que dissemina a contaminação; ou proveniente do uso de um mesmo ingrediente contaminado. As demais amostras positivas do mesmo estabelecimento

apresentaram espécies e perfis de virulência diferentes, o que não torna possível fazer tal associação.

5.4. Susceptibilidade aos antimicrobianos

No presente trabalho foi priorizada a análise de susceptibilidade, para os antimicrobianos preconizados pelo Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (BrCast) (2019), pelo fato de ser um guia na escolha dos antibióticos a serem testados pelos laboratórios de análises clínicas brasileiros. Para a realização da avaliação da susceptibilidade, houve dificuldade em relação a aquisição de dois antibióticos preconizados no manual por não serem discos encontrados comercialmente prontos na dosagem indicada, são eles: sulfametoxazol-trimetoprim (23,75-1,25µg), o qual não foi testado na pesquisa; e a ceftazidima, cuja concentração indicada é de 10µg, mas comercialmente é encontrada na concentração de 30µg, assim, esse antibiótico foi testado na concentração comercializada, e seus resultados foram comparados a tabela *Enterobacteriaceae* presente no CLSI M100-S29 (2019).

Além dos antibióticos preconizados pelo BrCast, três outros foram escolhidos para o teste: tetraciclina, cujos resultados foram analisados segundo a tabela "*Enterobacteriaceae*" presente no CLSI M100-S29 (2019); e amoxicilina-ácido clavulâmico e imipenem, cujos resultados foram analisados conforme a tabela "*Enterobacterales*" presente no BrCast (2019). A escolha da tetraciclina, pertencente a classe de mesmo nome, foi baseada nos achados literários que já registraram genes de resistência à classe (SCHMIDT et al., 2001), somado ao fato de ser um dos antimicrobianos utilizados na aquicultura, regulamentado pelo MAPA, pertencer a mesma classe (AGRICULTURA, 2020). A escolha da amoxicilina-ácido clavulâmico, foi baseada na resistência intrínseca, já relatada, do grupo aos β-lactâmicos associados a um inibidor de beta-lactamase (STRATEV; ODEYEMI, 2016) e por ser uma droga empregada no combate de bactérias pertencentes a família *Enterobacteriaceae* (HUMPHRIES; SCHUETZ, 2015), outro grupo intimamente relacionado com gastroenterites. A escolha do imipenen foi fundamentada também no fato de já haver relatos da resistência das *Aeromonas* ao β–lactâmicos associado a crescente preocupação da seleção de micro-organismos produtores de carbapenases (SEIBERT et al., 2014).

Dos resultados obtidos (Tabela 22), as drogas com maior eficácia contra *Aeromonas* foram cefepima, ceftazidima (cefalosporinas) e ciprofloxaxino (fluoquinolona), pois todos os isolados apresentaram sensibilidade ao medicamento. O monobactâmico aztreonam apresentou 3% de cepas resistentes e 2% de cepas com resistência intermediária; já a fluoquinolona levofloxacino apresentou 2% das cepas com resistência intermediária.

Tabela 22. Frequência do perfil de susceptibilidade dos antibióticos testados em porcentagem (%).

Tipo de amostra	CPM			CAZ			ATM			CIP			LVX			TET			AMC			IPM		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Temaki	100	0	0	100	0	0	94	2	4	100	0	0	98	2	0	76	6	18	11	0	89	80	11	9
Melão	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	100	96	2	2
Porcentagem total	100	0	0	100	0	0	95	2	3	100	0	0	98	2	0	78	5	17	10	0	90	78	12	10

N= número de isolados; S= Sensível; I= Intermediário;R= Resistente.

Antibióticos: **CPM**= Cefepima; **CAZ**= Ceftazidima; **ATM**= Aztreonam; **CIP**= Ciprofloxacino; **LVX**= Levofloxacino; **TET**= Tetraciclina; **AMC**= Amoxicilina-ácido clavulânico; **IPM**= Imipenem.

Assim, os resultados apresentados frente aos antibióticos preconizados pelo BrCast foram satisfatórios, uma vez que essas drogas foram em sua grande maioria eficientes, apesar de pertencerem a classe dos β-lactâmicos (cefalosporinas e monobactâmicos). *Aeromonas* spp. são conhecidas por produzem diferentes β-lactamases, das classes A a D, que lhes conferem resistências a algumas cefalosporinas e monobactâmicos (STRATEV; ODEYEMI, 2016), e a classe fluoquinolona, cuja resistência é rara, porém já relatada (JANDA; ABBOTT, 2010; POIREL; CATTOIR; NORDMANN, 2012).

Dos antibióticos que apresentaram resistência e não estavam na lista do BrCast, a amoxicilina-ácido clavulâmico foi o que apresentou o menor índice de sensibilidade, com 90% das cepas sendo resistentes ao medicamento. Esse resultado já era esperado, visto que algumas cepas de *Aeromonas* apresentam resistência aos inibidores de β-lactamase, como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (STRATEV; ODEYEMI, 2016). Mas, ainda sim, é um resultado que se destaca, pois o antibiótico amoxicilina é um dos listados pela Portaria 444 de 30 de dezembro de 2014 (BRASIL, 2015b), a qual estabeleceu o monitoramento de resistência, dentro vários antimicrobianos, à amoxicilina.

O segundo maior índice de resistência observado foi à tetraciclina, apresentando 17% das cepas resistentes. Confirmando novamente os relatos de resistência previstos na literatura (SCHMIDT et al., 2001). Esse índice é preocupante, uma vez que antimicrobianos regulamentados pelo MAPA, para uso em aquicultura, pertence a essa mesma classe (AGRICULTURA, 2020)

O terceiro maior índice de resistência foi ao imipenem, apresentando 10% das cepas resistentes. A resistência a esse antimicrobiano é uma constante preocupação na área médica, pois a resistência as carbapenases estão associadas as “superbactérias” que são altamente resistentes aos antibióticos de última geração (PAULA et al., 2016).

Quanto a multirresistência, apenas um isolado proveniente de uma amostra de temaki apresentou resistência a 3 antimicrobianos (ATM, IPM e AMC) ao mesmo tempo, a espécie desse isolado não foi confirmada, sendo classificada através do PCR como *Aeromonas* sp. e não possuía nenhum dos

genes de virulência pesquisados, sendo assim nenhuma associação entre genes de virulência e resistência pode ser feita.

Como afirmado por Nascimento e Araújo (2014), *Aeromonas* é o micro-organismo mais estudado quando se refere a resistência aos antimicrobianos de micro-organismos de ambientes aquáticos, isso devido ao alto impacto das infecções por *Aeromonas* em aquicultura. Assim, embora tenhamos obtido resultados satisfatórios frente aos antimicrobianos preconizados pelo BrCast para tratamento de infecções por *Aeromonas* em casos clínicos, o monitoramento constante da resistência de *Aeromonas* spp. aos antimicrobianos é de fundamental importância, uma vez que é conhecida a prática do uso de antibióticos e promotores de crescimento de forma indiscriminada na aquicultura, o que leva a uma pressão ambiental que aumenta a seleção de espécies resistentes (PEIXOTO et al., 2012). Assim, matéria-prima proveniente de aquiculturas que adotam esse tipo de prática são um risco constante ao consumidor, uma vez que pode estar ingerindo bactérias resistentes.

A pressão seletiva não acontece apenas na aquicultura, outra fonte que traz uma preocupação ainda maior são os efluentes hospitalares, caracterizados por uma mistura de bactérias patogênicas resistentes, medicamentos e bactérias ambientais. Esta combinação promove a disseminação dos genes de resistência no ambiente. Um estudo realizado no hospital universitário Clermont-Ferrand (França) identificou a formação de biofilmes na tubulação do esgoto, com a presença de bactérias resistentes ao imipenem, antibiótico beta-lactâmico de amplo espectro utilizado como última linha de defesa aos micro-organismos resistentes. Esse mecanismo de resistência é frequentemente associado aos elementos móveis, que facilitam sua disseminação. Entre as bactérias resistentes encontradas, houve a prevalência de *Aeromonas* que também apresentaram resistências associadas a outros antimicrobianos (ORY et al., 2019). No presente trabalho, também encontramos *Aeromonas* que apresentaram resistência ao imipenen, o que traz grande preocupação, uma vez que estes micro-organismos estão associados aos alimentos.

6. CONCLUSÕES

Os temakis apresentaram maior prevalência do gênero *Aeromonas,* que foram recuperados em altas contagens, bem acima da considerada dose infectante, e são potenciais patógenos presentes em um alimento que não passará por nenhum tratamento para ser eliminado antes do seu consumo. Estes resultados mostram a potencial necessidade de inclusão deste patógeno na legislação, especialmente nos alimentos preparados prontos para o consumo contendo produtos de origem animal, elaborados sem emprego de calor, consumidos crus.

Os estabelecimentos responsáveis pela preparação desse tipo de alimento devem avaliar os pontos críticos referente ao processo e implantar medidas efetivas a fim de minimizar a ocorrência de contaminação cruzada.

Os meios Ágar *Aeromonas* e Ágar Amido Ampicilina foram válidos na detecção e isolamento de *Aeromonas*, porém o último apresentou-se mais eficiente. Falsos negativos foram encontrados na detecção do micro-organismo, que foram associados ao alto número de contagem, assim, recomenda-se que para substratos presumidamente com altos índices de contagem, que a detecção não seja feita apenas após a etapa de enriquecimento, mas também de forma direta.

A identificação pela técnica de MALDI-TOF/MS para as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* demonstrou ser muito eficiente, pois correspondeu aos resultados constatados por PCR, e na prática, não foi necessário um protocolo extenso de extração das proteínas.

Apesar dos antibióticos preconizados pelo BrCast apresentarem desempenho satisfatório no combate a *Aeromonas* spp., garantindo assim fonte de tratamento eficaz, existe a preocupação de cepas do gênero serem reservatório de genes de resistência para outros antibióticos, como no caso da ácido clavulânico, tetraciclina e imipenem.

Assim, dos alimentos prontos para consumo pesquisados, os temakis são aqueles com grande potencial para a disseminação de *Aeromonas* à população. Os micro-organismos encontrados demonstraram potencial para promover gastroenterites, devido a presença de genes de virulência, e também apresentaram resistências a alguns antimicrobianos, em especial ao imipenem,

fator preocupante na disseminação de resistências. Portanto, a recomendação deste estudo é que tal alimento deve ser evitado por crianças, idosos, grávidas e pessoas imunocomprometidas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-EL-MALEK, A. M. Incidence and virulence characteristics of *Aeromonas* spp. in fish. **Veterinary World**, v. 10, n. 1, p. 34–37, 2017.

ABRAHIM, A. et al. Incidence of *Aeromonas* spp. in marine fish and the environment of fish markets in northern Greece. **Italian Journal of Food Science**, v. 19, n. 1, p. 111–116, 2007.

AGRICULTURA, M. DA. **Lista de produtos veterinários registrados no MAPA com base nas informações no PUBLIVET**. Disponível em < http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/ produtos-veterinarios/produtos-veterinarios> Acesso: 01 mar. 2020

ALBERT, M. J. et al. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. Isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3785–3790, 2000.

ALHAZMI, M. I. Isolation of *Aeromonas* spp. from food products: Emerging aeromonas infections and their significance in public health. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 4, p. 927–929, 2015.

ALPERI, A ; FIGUERAS, M. J. Human isolates of *Aeromonas* possess Shiga toxin genes (stx 1 and stx 2) highly similar to the most virulent gene variants of Escherichia coli. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Deseases**, v. 16, n. 10, p. 1563–1567, 2010.

ANDELOVÁ, A.; PORAZILOVÁ, I.; KREJCI, E. *Aeromonas* agar is a useful selective medium for isolating aeromonads from faecal samples. **Journal of Medical Microbiology**. v.55, n.11, p.1605-1606, 2006.

ARAÚJO, V. S. et al. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 6, p. 1172–1177, 2002.

ARAVENA-ROMÁN, M. et al. *Aeromonas aquariorum* is widely distributed in clinical and environmental specimens and can be misidentified as *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3006–3008, 2011.

BERGEY, D. .; HOLT, J. G. *Aeromonas*. In: **Bergey´s Manual of determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1993.

BHOWMICK, U. D.; BHATTACHARJEE, S. Bacteriological, clinical and virulence aspects of *Aeromonas*-associated diseases in humans. **Polish Journal of Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 137–149, 2018.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibily Testing, BRCast. **Tabela de Pontos de Corte Clínicos do BrCAST - EUCAST**, válida a partir de 04-10-2019. Disponível em <http://brcast.org.br >. Acesso: 18 out.2019

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibily Testing, BRCast. **Teste sensibilidade aos antimicrobianos- Método de disco**. Versão 6.0. Janeiro de 2017. Disponível em <http://brcast.org.br>. Acesso: 02 abr.2019

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de jan.e 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. **Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Seção 1, p. 45-53, 10 jan. 2001.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30 de 30 de dezembro de 2014 do Ministério da pesca e aquicultura. **Programa Nacional de Monitoramentode Resistência a Antimicrobianos em Recursos Pesqueiros**.Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Seção 1, p.82, 02 jan 2015 a.

BRASIL. Portaria n°444 de 30 de dezembro de 2014. **Estabelece o escopo e as metodologias a serem aplicadas em peixes no Programa de Monitoramento de Resistência a Antimicrobianos em Recursos Pesqueiros**, Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Seção 1, p.83, 02 jan 2015 b.

BRASIL. Resolução RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. **Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Seção 1, p. 96, 26 jan 2019.

BUCHANAN, ROBERT L; PALUMBO, S. A. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning. **Journal of Food Safety**, v. 7, p. 15–29, 1985.

BULHÕES, C. C. C.; ROSI JÚNIOR, O. D. Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo-de-minas frescal artesanal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veteninária e Zootecnia**, v. 54, n. 3, p. 320–324, 2002.

CARNEIRO, M. S.; JUNIOR, O. D. R. Bactérias do gênero *Aeromonas* no fluxograma de beneficiamento do leite tipo A e seu comportamento frente à ação de antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 3, p. 271–276, 2006.

CARUSI, J. **Ocorrência, perfil de virulência e resistência aos antimicrobianos de *Aeromonas* sp. em água de irrigação e vegetais**. 2017. 1 recurso online (100 p.). Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/322828>. Acesso em: 1 set. 2018.

CASTRO-ESCARPULLI, G. et al. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 41–49, 2003.

CHOPRA, A. K.; HOUSTON, C. W. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. **Microbes and Infection**, p. 1129–1137, 1999.

COSCELLI, G. A. et al. *Aeromonas sobria*, an outbreak of natural infection in cultured silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) in Argentina. **Journal of Fish Diseases**, v. 40, n. 12, p. 1929–1933, 2017.

DA SILVA, B. C. et al. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*×*Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by Aeromonas hydrophila. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 6, p. 908–916, 2012.

DA SILVA, M. L. et al. Occurrence of pathogenic microorganisms in fish sold in São Paulo, Brazil. **Journal of Food Safety**, v. 30, n. 1, p. 94–110, 2010.

DI PINTO, A. et al. Detection of potentially pathogenic *Aeromonas* isolates from ready-to-eat seafood products by PCR analysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 269–273, 2012.

DU, Z. et al. A case of *Aeromonas veronii* infection in golden Taiwanese loach (*Paramisgurnus dabryanus*) at low water temperature. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 3, p. 1307–1312, 2020.

ELBEHIRY, A. et al. Proteomic characterization and discrimination of *Aeromonas* species recovered from meat and water samples with a spotlight on the antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila*. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 11, p. 1–14, 2019.

FERNÁNDEZ-BRAVO, A.; FIGUERAS, M. J. An update on the genus *Aeromonas*: Taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 3–6, 2020.

FOSSE, T.; GIRAUD-MORIN, C.; MADINIER, I. Phénotypes de résistance aux β-lactamines dans le genre *Aeromonas*. **Pathologie Biologie**, v. 51, n. 5, p. 290–296, 2003.

FREITAS, A. . et al. Occurence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 1, p. 62– 65., 1993.

GASTALHO, S.; SILVA, G. J.; RAMOS, F. Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance : Health care impact. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, p. 29–45, 2014.

GHENGHESH, K. S.;BELHAJ K. ; EL-AMIN W.B. ; EL-NEFATHI S. E.; ZALMUM A. Microbiological quality of fruit juices sold in Tripoli–Libya. **Food Control**, 16: 855–858, 2005.

GONÇALVES PESSOA, R. B. et al. The genus *Aeromonas*: A general approach. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, n. March, p. 81–94, 2019.

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, n. 1, p. 131–136, 1999.

HOEL, S. et al. Assessment of microbiological quality of retail fresh sushi from selected sources in Norway. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 5, p. 977–982, 2015.

HOEL, S.; VADSTEIN, O.; JAKOBSEN, A. N. Species distribution and prevalence of putative virulence factors in Mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from fresh retail sushi. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–11, 2017.

HOEL, S.; VADSTEIN, O.; JAKOBSEN, A. N. The significance of mesophilic *Aeromonas* spp. In minimally processed ready-to-eat seafood. **Microorganisms**, v. 7, n. 3, p. 1–25, 2019.

HOFER, E. et al. *Aeromonas* associated with an acute diarrhea outbreak in São Bento do Una, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 217–220, 2006.

HOWARD, S. P. et al. Nucleotide Sequence of the Gene for the Hole-Forming Toxin Aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 6, p. 2869–2871, 1987.

HUMPHRIES, R. M.; SCHUETZ, A. N. Antimicrobial susceptibility testing of bacteria that cause gastroenteritis. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 2, p. 313–331, 2015.

IGBINOSA, I. H. et al. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. **The Scientific World Journal**, p. 1–13, 2012.

ISONHOOD, J. H.; DRAKE, M. *Aeromonas* species in foods. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 3, p. 575–582, 2002.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35–73, 2010.

LAMY, B.; KODJO, A.; LAURENT, F. Identification of *Aeromonas* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, n. 1, p. 1–5, 2011.

LI, F. et al. Distribution, virulence-associated genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolates from diarrheal patients and water, China. **Journal of Infection**, v. 70, n. 6, p. 600–608, 2015.

LI, F. et al. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* cause motile *Aeromonas* septicaemia in the cultured Chinese sucker, *Myxocyprinus*

asiaticus. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 5, p. 1515–1526, 2019.

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S. W. Aeromonadales. In: BRENNER, D. J. et al. (Eds.). . **Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology**. Philadelphia,PA,USA: Williams & Wilkins, 2005. p. 556–578.

MARTINS, F. O. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (sushi e sashimi) a base de pescado cru servidas em bufês na cidade de São Paulo**. 2006. Dissertação (Mestrado em Serviços de Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. doi:10.11606/D.6.2006.tde-13122006-141234. Acesso em: 2020-02-09.

MARTINS, M. *Aeromonas caviae* during mortality on Nile Tilapia and supplementation with vitamin C in the diet. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34(4), n. January, p. 585–590, 2008.

MELAS, D. S.; PAPAGEORGIOU, D. K.; MANTIS, A. I. Enumeration and Confirmation of *Aeromonas hydrophila , Aeromonas caviae , and Aeromonas sobria* Isolated from Raw Milk and Other Milk Products in Northern Greece. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 5, p. 463–466, 1999.

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

MORGADO, C. et al. Microbiological quality in convenient ready-to-eat vegetables during shelf life. **AIMS Agriculture and Food**, v. 3, n. 4, p. 372–383, 2018.

MOSSER, T. et al. Exposure to pairs of *Aeromonas* strains enhances virulence in the *Caenorhabditis elegans* infection model. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. NOV, p. 1–14, 2015.

NASCIMENTO, E. D.; ARAÚJO, M. F. F. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquatic environments in Brazil: a systematic review. **Revista Ambiente e Água**, v. 9, n. 2, p. 239–249, 2014.

NIKIFOROV, I. et al. *Aeromonas hydrophila* Sepsis Associated with Consumption of Raw Oysters. **Case Reports in Infectious Diseases**, v. 2014, p. 1–3, 2014.

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

ORY, J. et al. Biofilms in hospital effluents as a potential crossroads for carbapenemase-encoding strains.**Science of the Total Environment**, v.657, p.7-15, 2019.

PARKER, J. L.; SHAW, J. G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**, v. 62, n. 2, p. 109–118, 2010.

PASTERNAK, J. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. **Einstein**, v. 10, n. 1, p. 118–119, 2012.

PAULA, V. G. DE et al. Enterobacteria producing carbapenemase : prevention of superbugs dissemination in ICU ' s. **Universitas: Ciências da Sáude**, v. 14, n. 2, p. 175–185, 2016.

PEIXOTO, L. J. S. et al. *Aeromonas* spp.: Fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivo Instituto Biologia**, v. 79, n. 3, p. 453–461, 2012.

PEREZ-SANCHO, M. et al. Limited performance of MALDI-TOF for identification of fish *Aeromonas* isolates at species level. **Journal of Fish Diseases**, v. 41, n. 10, p. 1485–1493, 2018.

PERSSON, S. et al. Identification of clinical *Aeromonas* species by *rpoB* and *gyrB* sequencing and development of a multiplex pcr method for detection of *Aeromonas hydrophila, A. caviae, A. veronii*, and *A. media*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 653–656, 2015.

POIREL, L.; CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. FEB, p. 1–7, 2012.

PORTE, L. et al. Head-to-head comparison of Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry in Chile. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–24, 2017.

PRADO, B. G. et al. Pontos críticos de controle de qualidade higiênico-sanitária do preparo de shushis e sashimis no município de São Vicente, São Paulo. **Seguranca Alimentas e Nutricional**, v. 21, n. 1, p. 359–372, 2014.

PRAVEEN, P. K. et al. Incidence of *Aeromonas* spp. infection in fish and chicken meat and its related public health hazards: A review. **Veterinary World**, v. 9, n. 1, p. 6–11, 2016.

PRIDGEON, J. W. et al. Identification, virulence, and mass spectrometry of toxic ECP fractions of West Alabama isolates of *Aeromonas hydrophila* obtained from a 2010 disease outbreak. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 3–4, p. 336–343, 2013.

PRIDGEON, J. W. et al. *Aeromonas, Plesiomonas* and *Arcobacter*. In: ASSOCIATION, A. P. H. (Ed.). . **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 5. ed. Washington: APHA, 2015. p. 347–364.

RODRIGUES, E. **Pesquisa de *Aeromonas* spp. em tilápia (*Oreochromis***

***niloticus*), cultivada no estado do Rio de Janeiro-Brasil: isolamento, identificação de espécies e avaliação da sensibilidade antimicrobiana**.2007. Tese (doutorado). Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil.

ROBINSON, J. et al. Comparison of direct plating with the use of enrichment culture for isolation of *Aeromonas* spp. from faeces. **Journal of Medical Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 315–317, 1986
.
RUIZ, J.; PONS, M. J.; GOMES, C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 196–203, 2012.

SAFFACHE, F. **Comprehensive DNA Quantitation**. Disponível em: <https://www.genengnews.com/magazine/235/comprehensive-dna-quantitation/>. Acesso em: 28 ago. 2019.

SANTOS, M. I. et al. Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 275–281, 2012.

SCHMIDT, A. S. et al. Incidence , Distribution , and Spread of Tetracycline Resistance Determinants and Integron-Associated Antibiotic Resistance Genes among Motile *Aeromonas* from a Fish Farming Environment. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5675–5682, 2001.

SEIBERT, G. et al. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 12, n. 3, p. 282–286, 2014.

SEN, K.; RODGERS, M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: A PCR identification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 5, p. 1077–1086, 2004.

SENG, P. et al. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. **Future Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1733–1754, 2010.

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

SHIN, H. B. et al. Comparison of maldi-tof ms, housekeeping gene sequencing, and 16s rRNA gene sequencing for identification of *Aeromonas* clinical isolates. **Yonsei Medical Journal**, v. 56, n. 2, p. 550–555, 2015.

SILVA, L. C. A. DA et al. Genetic diversity and virulence potential of clinical and environmental Aeromonas spp. isolates from a diarrhea outbreak. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.

SILVA, G.; SILVA, A. M. A. D.; FERREIRA, M. P. DE B. **Produção Alimentícia**

- Processamento de leite. Recife: EDUFRPE, 2012.

SILVA, R. DE S . E; PAES, Â. T. Por Dentro da Estatística : teste de concordância de Kappa. **Educ. Contin. Saúde einstein**, v. 10, n. 4, p. 165–166, 2012.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. AUG, p. 1–16, 2015.

SKRODENYTE-ARBAČIAUSKIENE, V. et al. Identification of *Aeromonas salmonicida* in European perch from North Lithuanian rivers during mass mortalities in 2008. **Central European Journal of Biology**, v. 5, n. 6, p. 831–838, 2010.

SKRODENYTE-ARBAČIAUSKIENE, V. et al. *Aeromonas salmonicida* infected fish transfer disease to healthy fish via water. **Central European Journal of Biology**, v. 7, n. 5, p. 878–885, 2012.

STRATEV, D.; ODEYEMI, O. A. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. **Journal of infection and public health**, v. 9, n. 5, p. 535–544, 2016.

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

SZABO, E. A. et al. Survey of psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 456–460, 2000.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 4, p. 913–918, 2017.

TAVARES, A. B.; CERESER, N. D.; TIMM, C. D. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em alimentos de origem animal e sua importância em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, n. 0, p. 1–8, 2015.

TEUNIS, P.; FIGUERAS, M. J. Reassessment of the enteropathogenicity of Mesophilic *Aeromonas* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. SEP, p. 1–12, 2016.

TOMÁS, J. M. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. **International Scholarly Research Network Microbiology**, v. 2012, p. 1–22, 2012.

VÁVROVÁ, A. et al. Evaluation of the MALDI-TOF MS profiling for identification of newly described *Aeromonas* spp. **Folia Microbiologica**, v. 60, n. 5, p. 375–383, 2015.

VILLARI, P. et al. Prevalence and molecular characterization of *Aeromonas* spp. in ready-to-eat foods in Italy. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 12, p. 1754–1757, 2000.

VIVEKANANDHAN, G.; HATHA, A. A. M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in fish and prawns from the seafood market of Coimbatore, South India. **Food Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 133–137, 2005.

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

WONG, C. Y. F.; HEUZENROEDER, M. W.; FLOWER, R. L. P. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. **Microbiology**, v. 144, n. 2, p. 291–298, 1998.

XANTHOPOULOS, V.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Occurrence and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in minimally processed fresh vegetable salads. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 393–398, 2010.

YUCEL, N.; ERDEM, B.; KAYA, D. Some virulence properties and characterization of motile Aeromonas species from milk and white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 2, p. 106–110, 2005.

ZHANG, Q. et al. A foodborne outbreak of *Aeromonas hydrophila* in a college, Xingyi City, Guizhou, China, 2012. **Western Pacific Surveillance and Response Journal**, v. 3, n. 4, p. 39–43, 2012.

ZHOU, Y. et al. Taxonomy, virulence genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolated from extra-intestinal and intestinal infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2019.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A- Amostras adquiridas no comércio da cidade de Campinas-SP (continua).

N°	Amostra	Data da análise	Data fabricação/ embalagem	Data validade	Lote
1	Ricota fresca	07/06/2018	04/05/2018	03/07/2018	123
2	Ricota fresca	12/06/2018	28/05/2018	12/07/2018	148
3	Queijo Minas frescal	12/06/2018	06/06/2018	30/06/2018	685442M
4	Salada de frutas	12/06/2018	12/06/2018	14/06/2018	S/L
5	Queijo Minas frescal (pedaço)	19/06/2018	18/06/2018	24/06/2018	S/L
6	Queijo Minas frescal	19/06/2018	13/06/2018	02/07/2018	133
7	Melão amarelo	19/06/2018	18/06/2018	20/06/2018	S/L
8	Melancia	19/06/2018	18/06/2018	20/06/2018	S/L
9	Salada de frutas	26/06/2018	25/06/2018	26/06/2018	S/L
10	Queijo Minas frescal	26/06/2018	01/06/2018	01/08/2018	S/L
11	Ricota fresca	26/06/2018	08/06/2018	03/07/2018	E158/01
12	Ricota fresca	26/06/2018	24/05/2018	24/07/2018	18052343
13	Queijo Minas Frescal	26/06/2018	15/06/2018	04/07/2018	Ilegível
14	Queijo Minas Frescal (pedaço)	26/06/2018	25/06/2018	29/06/2018	S/L
15	Melão Orange	26/06/2018	25/06/2018	26/06/2018	S/L
16	Melancia	26/06/2018	25/06/2018	27/06/2018	S/L
17	Salada de frutas	26/06/2018	25/06/2018	26/06/2018	S/L
18	Queijo fresco	09/07/2018	01/06/2018	30/08/2018	136199R
19	Ricota fresca	09/07/2018	21/06/2018	26/07/2018	L21
20	Salada de frutas	09/07/2018	07/07/2018	09/07/2018	S/L
21	Salada de frutas	09/07/2018	07/07/2018	09/07/2018	S/L
22	Queijo fresco	09/07/2018	06/07/2018	10/07/2018	S/L
23	Ricota fresca	09/07/2018	25/06/2018	19/07/2018	18361
24	Queijo Minas frescal (pedaço)	09/07/2018	07/07/2018	11/07/2018	S/L

APÊNCIDE A- Amostras adquiridas no comércio da cidade de Campinas-SP (continuação).

N°	Amostra	Data da análise	Data fabricação/ embalagem	Data validade	Lote
25	Salada de frutas	09/07/2018	08/07/2018	09/07/2018	S/L
26	Queijo Minas frescal	09/07/2018	27/06/2018	01/08/2018	0969
27	Salada de frutas	09/07/2018	07/07/2018	10/07/2018	S/L
28	Ricota fresca	18/07/2018	22/05/2018	21/07/2018	092605
29	Ricota fresca	18/07/2018	08/06/2018	07/08/2018	158
30	Queijo Minas Frescal	18/07/2018	04/07/2018	03/08/2018	28
31	Queijo Minas frescal	18/07/2018	15/07/2018	29/07/2018	975
32	Salada de frutas	18/07/2018	17/07/2018	19/07/2018	S/L
33	Queijo Minas frescal	18/07/2018	12/07/2018	10/08/2018	192 01
34	Queijo Minas frescal	18/07/2018	05/07/2018	19/08/2048	02
35	Salada de frutas	18/07/2018	18/07/2018	19/07/2018	S/L
36	Queijo Minas frescal	18/07/2018	05/07/2018	30/07/2018	186 06
37	Ricota fresca	18/07/2018	08/06/2018	06/09/2018	1170
38	Ricota fresca	01/10/2018	08/09/2018	07/10/2018	09/06/04
39	Ricota fresca	01/10/2018	19/09/2018	29/10/2018	262 08
40	Ricota fresca	01/10/2018	21/09/2018	20/11/2018	A6:48:48
41	Ricota fresca	01/10/2018	13/09/2018	03/10/2018	04
42	Salada de frutas	01/10/2018	01/10/2018	03/10/2018	S/L
43	Ricota fresca	01/10/2018	13/09/2018	12/11/2018	2562018
44	Ricota fresca	01/10/2018	29/08/2018	28/10/2018	10/10/18
45	Salada de frutas	01/10/2018	28/09/2018	02/10/2018	S/L
46	Temaki de salmão	07/11/2018	07/11/2018	07/11/2018	S/L
47	Temaki de salmão	07/11/2018	07/11/2018	07/11/2018	S/L
48	Temaki de atum	07/11/2018	07/11/2018	07/11/2018	S/L
49	Temaki de peixe branco (agulhão)	07/11/2018	07/11/2018	07/11/2018	S/L

APÊNDICE A- Amostras adquiridas no comércio da cidade de Campinas-SP (continuação)

N°	Amostra	Data da análise	Data fabricação/ embalagem	Data validade	Lote
50	Temaki de salmão	07/11/2018	07/11/2018	07/11/2018	S/L
51	Temaki de peixe branco (Saint Peter)	07/11/2018	07/11/2018	07/11/2018	S/L
52	Temaki de atum	26/11/2018	26/11/2018	26/11/2018	S/L
53	Temaki de peixe branco (Tilápia)	26/11/2018	26/11/2018	26/11/2018	S/L
54	Temaki de salmão	26/11/2018	26/11/2018	26/11/2018	S/L
55	Melão amarelo	10/12/2018	08/12/2018	12/12/2018	S/L
56	Melancia	10/12/2018	08/12/2018	12/12/2018	S/L
57	Melancia baby	10/12/2018	09/12/2018	10/12/2018	S/L
58	Melancia	10/12/2018	10/12/218	12/12/2018	S/L
59	Melão	10/12/2018	10/12/2018	12/12/2018	S/L
60	Melão Orange	10/12/2018	09/12/2018	10/12/2018	S/L
61	Temaki de salmão	07/01/2019	07/01/2019	07/01/2019	S/L
62	Temaki de atum	07/01/2019	07/01/2019	07/01/2019	S/L
63	Temaki de peixe branco (Tilápia)	07/01/2019	07/01/2019	07/01/2019	S/L
64	Temaki de salmão	07/01/2019	07/01/2019	07/01/2019	S/L
65	Temaki de salmão	07/01/2019	07/01/2019	07/01/2019	S/L
66	Temaki de atum	07/01/2019	07/01/2019	07/01/2019	S/L
67	Temaki de peixe branco (Saint Peter)	07/01/2019	07/01/2019	07/01/2019	S/L
68	Temaki de salmão	08/01/2019	08/01/2019	08/01/2019	S/L
69	Temaki de atum	08/01/2019	08/01/2019	08/01/2019	S/L

APÊNDICE A- Amostras adquiridas no comércio da cidade de Campinas-SP (continuação)

N°	Amostra	Data da análise	Data fabricação/ embalagem	Data validade	Lote
70	Temaki de peixe branco (Tilápia)	08/01/2019	08/01/2019	08/01/2019	S/L
71	Melancia	23/01/2019	22/01/2019	Não consta	S/L
72	Melancia	23/01/2019	22/01/2019	23/01/2019	S/L
73	Melão amarelo	23/01/2019	22/01/2019	23/01/2019	S/L
74	Melão amarelo	23/01/2019	22/01/2019	23/01/2019	S/L
75	Melancia	23/01/2019	Não consta	23/01/2019	S/L
76	Melancia	23/01/2019	22/01/2019	24/01/2019	S/L
77	Melão amarelo	23/01/2019	22/01/2019	24/01/2019	S/L
78	Melancia	23/01/2019	23/01/2019	24/01/2019	S/L
79	Melão amarelo	16/03/2019	16/03/2019	17/03/2019	S/L
80	Melão Dino	18/03/2019	18/03/2019	19/03/2019	S/L
81	Temaki de salmão	18/03/2019	18/03/2019	18/03/2019	S/L
82	Temaki de salmão	19/05/2019	19/05/2019	19/05/2019	S/L
83	Temaki de atum	19/05/2019	19/05/2019	19/05/2019	S/L
84	Temaki de peixe branco (Tilápia)	19/05/2019	19/05/2019	19/05/2019	S/L
85	Temaki de salmão	19/05/2019	19/05/2019	19/05/2019	S/L
86	Temaki de atum	19/05/2019	19/05/2019	19/05/2019	S/L
87	Temaki de peixe branco (Tilápia)	19/05/2019	19/05/2019	19/05/2019	S/L
88	Temaki de salmão	20/05/2019	20/05/2019	20/05/2019	S/L
89	Temaki de peixe branco (Tilápia)	20/05/2019	20/05/2019	20/05/2019	S/L
90	Temaki de salmão	20/05/2019	20/05/2019	20/05/2019	S/L
91	Temaki de atum	20/05/2019	20/05/2019	20/05/2019	S/L

APÊNDICE B- Detalhamento das frutas minimamente processadas**.**

Número	Amostra	Composição
4	Salada de frutas	Morango, uva, manga, melão amarelo e kiwi
7	Melão amarelo	Melão amarelo
8	Melancia	Melancia
9	Salada de frutas	Mamão, manga, melão e morango
15	Melão Orange	Melão Orange
16	Melancia	Melancia
17	Salada de frutas	Melão, mamão e manga
20	Salada de frutas	Mamão, kiwi, manga e melão
21	Salada de frutas	Mamão, kiwi, manga e melão
25	Salada de frutas	Melão rei, mamão formosa, manga palmer e morango
27	Salada de frutas	Melão e mamão
32	Salada de frutas	Manga, mamão, melão e uva
35	Salada de frutas	Mamão, manga, uva, morango e melão
42	Salada de frutas	Banana, mamão, laranja, melão e maçã
45	Salada de frutas	Melão amarelo, manga, mamão formosa, uva verde e roxa
55	Melão amarelo	Melão amarelo
56	Melancia	Melancia
57	Melancia baby	Melancia Baby
58	Melancia	Melancia
59	Melão	Melão
60	Melão	Melão Orange
71	Melancia	Melancia
72	Melancia	Melancia
73	Melão amarelo	Melão amarelo
74	Melão amarelo	Melão amarelo
75	Melancia	Melancia
76	Melancia	Melancia
77	Melão amarelo	Melão amarelo
78	Melancia	Melancia
79	Melão amarelo	Melão amarelo
80	Melão Dino	Melão Dino

APÊNDICE C- Teste do qui-quadrado para verificar associação do tipo de peixe e os resultados das contagens e detecções.

	Tipos de peixes						
	Atum		Branco		Salmão		
	Freq.	%	Freq.	%	Freq.	%	p-valor
Contagem AA							-
Não	8	30,8%	7	26,9%	11	42,3%	
Sim	0	0%	2	50%	2	50%	
Contagem SA							0,330
Não	7	35%	5	25%	8	40%	
Sim	1	10%	4	40%	5	50%	
Detecção AA							0,165
Não	7	35%	4	20%	9	45%	
Sim	1	10%	5	50%	4	40%	
Detecção SA							0,556
Não	3	18,8%	5	31,3%	8	50%	
Sim	5	35,7%	4	28,6%	5	35,7%	
TOTAL							
Ausente	3	30,0%	2	20,0%	5	50,0%	
presente	5	25,0%	7	35,0%	8	40,0%	

APÊNDICE D- Comparação múltipla de Kruskal-Wallis para verificar associação entre os valores de contagens em meio AA e SA e o tipo de temaki

	Tipo de peixe	Média	DP	Mediana	p-valor
					0,386
Ágar *Aeromonas*	Atum	0	0	0	
	Branco	11778	31756	0	
	Salmão	1831	4930	0	
					0,275
Ágar Amido Ampicilina	Atum	2000	5657	0	
	Branco	37556	52863	0	
	Salmão	21477	71734	0	

APÊNDICE E- Comparação de Kruskal-Wallis para verificar associação entre o total de virulência e a espécie de *Aeromonas.*

Espécie	Total de virulência			
	Média	Mediana	DP	p-valor
				<0,001*
A. caviae	0	0	1	
A. hydrophila	4	4	2	
A. veronii	2	2	2	
Outras *Aeromonas* sp.	2	3	2	

9. ANEXOS

ANEXO A-Padrões microbiológicos para alimentos RDC N°12 de 2 de janeiro 2001 (continua)

Grupo de alimentos	Microrganismo	Tolerância para a Amostra Indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
1. Frutas, Produtos de Frutas e Similares						
b) frescas, "in natura", preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto.	Coliformes a 45ºC/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5X10^2$
	Salmonella sp/25g	Ausente	5	0	Ausente	-
7. Pescados e produtos de pesca						
a) pescado, ovas de peixes, crustáceos e moluscos cefalópodes "in natura", resfriados ou congelados não consumido cru; moluscos bivalves "in natura", resfriados ou congelados, não consumido cru; carne de rãs "in natura", refrigerada ou congelada	*Estaf*.coag. positiva/g	10^3	5	2	$5X10^2$	10^3
	Salmonella sp./25g	Ausente	5	0	Ausente	-
	Salmonella sp./ 25g	Ausente	5	0	Ausente	-

ANEXO A-Padrões microbiológicos para alimentos RDC N°12 de 2 de janeiro 2001 (continuação)

Grupo de alimentos	Microrganismo	Tolerância para a Amostra Indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
8. Leite de Bovinos e de outros mamíferos e derivados						
d) de alta umidade: 46% <umid 55%, exceção dos queijos quatriolo, cremoso, criolo e de coalho; de muita alta umidade: umid> 55%, com bactérias lácteas abundantes e viáveis, incluído o Minas frescal correspondente.	Coliformes a 45ºC/g	$5X10^3$	5	2	10^3	$5X10^3$
	Estaf.coag. positiva/g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Ausente	5	0	Ausente	-
	L.monocytogenes /25g	Ausente	5	0	Ausente	-
22. Pratos Prontos Para o Consumo (Alimentos Prontos de Cozinhas, Restaurantes e similares)						
b) a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi, etc.)	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag. positiva/g	$5X10^3$	5	3	10^2	10^3
	V.parahaemolyticus (específico para produtos à base de pescados)	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/ 25g	Ausente	5	0	Ausente	-

m: é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável;
M: é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis;
n: é o número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente. Nos casos nos quais o padrão estabelecido é ausência em 25g,é possível a mistura das alíquotas retiradas de cada unidade amostral, respeitando-se a proporção p/v (uma parte em peso da amostra, para 10 partes em volume do meio de cultura em caldo);
c: é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M (plano de três classes). Nos casos em que o padrão microbiológico seja expresso por "ausência", c é igual a zero, aplica-se o plano de duas classes.
Fonte: BRASIL, 2001

ANEXO B- Padrões microbiológicos para alimentos RDC N°331 (IN N°60) de 23 de dezembro de 2019 (continua).

Categorias Específicas	Micro-organismo / Toxina / Metabólito	n	c	m	M
1.Frutas e derivados					
b)Preparadas (inteiras, descascadas ou fracionadas), sanificadas, refrigeradas ou congeladas	*Salmonella* /25g	10	0	Ausente	-
	Escherichia coli /g	5	2	10	10^2
7. Pescados					
a) Pescados (peixes, crustáceos, moluscos) e miúdos (ovas, moela, bexiga natatória) crus, temperados ou não, frescos, resfriados ou congelados	Histamina (mg/Kg), somente para peixes com elevado teor de histidina (Carangidae, Gempylidae, Istiophoridae, Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae, Scombresosidae)	O limite máximo de histaminas deve ser 100 mg/kg (cem miligramas por quilograma) de tecido muscular, tomando como base uma amostra composta por 9 (nove) unidades amostrais e nenhuma unidade amostral pode apresentar resultado superior a 200 mg/kg (duzentos miligramas por quilograma).			
	Salmonella /25g	5	0	Ausente	-
	Estafilococos coagulase positiva/g	5	2	10^2	10^3
	Escherichia coli /g, para produtos não consumidos crus	5	2	50	$5X10^2$
	Escherichia coli /g, para produtos consumidos crus	5	2	10	10^2
9.Leites e derivados					
b) Queijos	Enterotoxinas estafilocócicas (ng/g)	5	0	Ausente	-
	Salmonella/25g	5	0	Ausente	-
	Estafilococos coagulase positiva/g	5	2	10^2	10^3
	Escherichia coli /g, para queijos ralado ou em pó	5	2	10^2	$5x10^2$
	Escherichia coli /g, para queijos com umidade abaixo de 46%	5	2	10	10^2
	Escherichia coli /g, para queijos com umidade igual ou acima de 46%	5	1	10^2	10^3

ANEXO B- Padrões microbiológicos para alimentos RDC N°331 (IN N°60) de 23 de dezembro de 2019 (continuação).

Categorias Específicas	Micro-organismo / Toxina / Metabólito	n	c	m	M
b) Queijos	Bolores e Leveduras/g, somente para queijos ralado ou em pó	5	2	$5x10^2$	$5x10^3$
21. Alimentos preparados prontos para o consumo					
a) Alimentos preparados prontos para o consumo, elaborados com emprego de calor	*Salmonella*/25g	5	0	Ausente	-
	B.cereus presuntivo/g, somente para preparações contendo cereais ou molhos	5	1	10^2	$5X10^2$
	Clostridium perfringens/g, somente para preparações com carnes	5	1	10^2	$5X10^2$
	Estafilococos coagulase positiva/g	5	2	10^2	$5x10^2$
	Escherichia coli /g	5	2	10	20
b) Alimentos preparados prontos para o consumo contendo produtos de origem animal, elaborados sem emprego de calor, consumidos crus	*Salmonella* /25g	5	0	Ausente	-
	Estafilococos coagulase positiva/g	5	1	10^2	10^3
	Escherichia coli / g	5	2	10	10^2

m: limite que, em um plano de três classes, separa unidades amostrais de “Qualidade Aceitável” daquelas de “Qualidade Intermediária” e que, em um plano de duas classes, separa unidades amostrais de “Qualidade Aceitável” daquelas de “Qualidade Inaceitável”;

M: limite que, em um plano de três classes, separa unidades amostrais de “Qualidade Intermediária” daquelas de “Qualidade Inaceitável”;

n:número de unidades amostrais a serem coletadas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente;

c:o tamanho da unidade analítica e a indicação do número de unidades amostrais toleradas com qualidade intermediária.

Fonte: BRASIL,2019

Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A80B487

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	**A80B487**
Usuário:	**UNICAMP**
CPF/CNPJ:	**46.068.425/0001-33**
Objeto do Acesso:	**Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso:	**Pesquisa**

Espécie

Aeromonas spp

Título da Atividade:	**Potencial patogênico de Aeromonas spp. em alimentos prontos para o consumo**

Equipe

Josie Roberta Teodoro	**UNICAMP**
Dirce Yorika Kabuki	**UNICAMP**
Juliana Carusi	**UNICAMP**

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado:	**10th International Conference on Clinical Micro**

Data do Cadastro:	**04/11/2018 18:51:33**
Situação do Cadastro:	**Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:16** de **17/05/2021**.

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO - SISGEN