

Soraia Casal Gastalho

Avaliação da resistência antimicrobiana de *Aeromonas* sp. e
Enterobacteriaceae em robalo e dourada provenientes
de sistemas de aquacultura

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Gabriela da Silva e co-orientada pelo Professor Doutor Fernando Ramos e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra com vista à obtenção de grau
de Mestre em Segurança Alimentar

A investigação apresentada nesta dissertação foi realizada no laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sob a orientação de Prof. Doutora Gabriela Silva e co-orientação de Prof. Doutor Fernando Ramos.

O presente trabalho foi financiado pelo FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade (COMPETE) e pela Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT) através do Projecto PTDC/AGR-ALI/122119/2010.



AGRADECIMENTOS

A todos os que, caminhando a meu lado, acreditaram que era possível.

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
Mas não esqueço de que minha vida
É a maior empresa do mundo...
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
Se tornar um autor da própria história...
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar
Um oásis no recôndito da sua alma...
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!
É ter segurança para receber uma crítica,
Mesmo que injusta...
Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

ABSTRACT

During many years, antibiotics have been used to ensure the health of the animals, and thereby, preventing disease. The administration of antibiotics has impact on the environment, and may lead to the emergence of antimicrobial resistance, both in human intestinal commensal bacteria or in fish bacteria and in the environment, with possible spread of resistance genes in bacterial populations.

Thus, the main objective of this project was to evaluate the susceptibility to antimicrobial agents in bacteria potentially pathogenic to humans, particularly in *Aeromonas* sp. and *Enterobacteriaceae* isolated from seabass and seabream, from aquaculture systems purchased in regional trade.

The intestinal content and branchia were collected from eight sea bass and six sea bream with origin from aquaculture systems from Portugal, Greece and Spain. Initially, 151 phenotypically diverse colonies were collected from the selective media for Gram-negative bacteria (MacConkey and *Aeromonas* agar), and tested for antimicrobial susceptibility against five antibiotics representatives of different antimicrobial families by disc diffusion method. The majority of bacteria were susceptible (72%) to the antibiotics tested. Only 43 bacteria showed resistance to one or more antibiotics. The majority of Gram-negative bacteria showed resistance to amoxicillin (86%), followed by trimethoprim (58%), nalidixic acid (23%), chloramphenicol (21%), and trimethoprim/sulfamethoxazole (7%). All bacteria were susceptible to tetracycline. These bacteria were identified presumptively by phenotypic methods, and then, by the amplification of 16S rDNA and sequencing. Beyond the identification of *Aeromonas* sp. and *Enterobacteriaceae*, it was possible to find other bacteria that grew in the previous media. Resistance was observed in 30% of *Aeromonas* sp., 23% of *Stenotrophomonas* sp., 19% of *Enterobacteriaceae* (*Pantoea* sp., *Buttiauxella* sp., *Klebsiella* sp. and *Erwinia* sp.), 16% of *Pseudomonas* sp., 5% of *Acetobacter* sp., 5% of *Achromobacter* sp. and 2% in *Vibrio* sp..

The beta-lactamases TEM and SHV were screened by PCR in the isolates resistant to amoxicillin, showing that 26 of the strains produced a *bla*_{TEM-type} enzyme, which was associated with the resistance to this penicillin. However, an amoxicillin- and trimethoprim-resistant *Aeromonas* sp. isolate that carried a plasmid with a length >10 Kb, it was not possible observe its transfer to the recipient *Escherichia coli* J53 (azide resistant) by conjugation assays.

In conclusion, the sea bass and sea bream available to the final consumer do not contain

bacteria with a high rate of antibiotic resistance, what might indicate a wise and controlled antibiotic delivery to aquaculture fish.

However, it should be noted the importance of the continuous monitoring of the administration of antibiotics to the animals for human consumption as well as studies to evaluate the resistance of potential pathogenic bacteria and the possible transfer of resistance determinants into human/animal and environmental bacteria.

Keywords: resistance, antibiotics, *Aeromonas* sp., *Enterobacteriaceae*, sea bass, sea bream

RESUMO

Durante muitos anos, os antibióticos foram utilizados para assegurar a saúde dos animais e, assim, prevenir doenças. A administração de antibióticos tem impacto sobre o ambiente e pode conduzir ao aparecimento de resistência antimicrobiana, tanto em bactérias comensais intestinais humanas como em bactérias de peixe e no meio ambiente, com a possível propagação de genes de resistência nas populações bacterianas.

Assim, o principal objectivo deste projecto foi avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos em bactérias potencialmente patogénicas para os seres humanos, particularmente em *Aeromonas* sp. e enterobactérias isoladas de robalo e dourada, a partir de sistemas adquiridos no comércio regional de aquacultura.

O conteúdo intestinal e branquias foram colectados de oito robalo e seis douradas com origem em sistemas de aquacultura de Portugal, Grécia e Espanha. Inicialmente, 151 colónias fenotipicamente diversas foram colectadas a partir de meios selectivos para bactérias Gram-negativas (MacConkey e *Aeromonas* agar), e testados para susceptibilidade antimicrobiana contra cinco antibióticos representantes de diferentes famílias de antimicrobianos pelo método de difusão em disco.

A maioria das bactérias são susceptíveis (72%) para os antibióticos testados. Só 43 bactérias mostraram resistência a um ou mais antibióticos. A maioria das bactérias Gram-negativas mostrou resistência a amoxicilina (86%), seguido de trimetoprim (58%), ácido nalidíxico (23%), cloranfenicol (21%) e trimetoprim / sulfametoxazol (7%). Todas as bactérias foram susceptíveis à tetraciclina. Estas bactérias foram presumivelmente identificados pelos métodos fenotípicos e, em seguida, por meio da amplificação de 16S rDNA e sequenciação. Para além da identificação de *Aeromonas* sp. e *Enterobacteriaceae*, foi possível encontrar outras bactérias que cresceram nos meios anteriores. A resistência foi observada em 30% das *Aeromonas* sp., 23% *Stenotrophomonas* sp., 19% de *Enterobacteriaceae* (*Pantoea* sp., *Buttiauxella* sp., *Klebsiella* sp. e *Erwinia* sp.), 16% de *Pseudomonas* sp., 5% de *Acetobacter* sp., 5% de *Achromobacter* sp. e 2% em *Vibrio* sp..

As β -lactamases TEM e SHV foram rastreadas por PCR nos isolados resistentes à amoxicilina, mostrando que 26 das estirpes produzem uma enzima do tipo bla_{TEM} , associada à resistência à penicilina. Foi também isolado o plasmídeo com um comprimento > 10 Kb, em uma *Aeromonas* sp. resistente a amoxicilina e trimetoprim, mas não foi possível observar a sua transferência para a *Escherichia coli* J53 receptora (azida resistente) por meio de ensaios

de conjugação.

Em conclusão, o robalo e dourada disponíveis ao consumidor final não contêm bactérias com uma alta taxa de resistência aos antibióticos, o que pode indicar uma entrega sábia e controlada dos antibióticos a peixes de aquacultura.

No entanto, deve notar-se a importância da monitorização contínua da administração de antibióticos a animais para o consumo humano, bem como estudos para avaliar o potencial de resistência das bactérias patogénicas e a eventual transferência de determinantes de resistência em bactérias humanas, animais e ambientais.

Palavras-chave: Resistência, antibióticos, *Aeromonas* sp., *Enterobacteriaceae*, robalo, dourada

ÍNDICE:

CAPÍTULO I

1.	Introdução	1
1.1.	Aquacultura	1
1.2.	Flora microbiana dos peixes	4
1.2.1.	<i>Aeromonas</i> sp.	5
1.2.1.	<i>Enterobacteriaceae</i>	8
1.3.	Uso de agentes antimicrobianos em Peixes	10
1.4.	Agentes antibacterianos – Mecanismos de Acção	13
1.5.	Resistência aos antimicrobianos	15
1.6.	Consequência da transferência de antimicrobianos para o Homem	17
1.7.	Consequência da transferência de antimicrobianos no ambiente	20
1.8.	Objectivos	21

CAPÍTULO II

2.	MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1.	Obtenção das amostras	23
2.2.	Meios de cultura selectivos	23
2.2.1.	Meio MC (<i>MacConkey</i>)	23
2.2.2.	Meio EMB (<i>Eosine Methylene Blue</i>)	23
2.2.3.	Meio AMB (<i>Aeromonas Medium Base</i>)	24
2.3.	Isolamento e identificação de bactérias por métodos fenotípicos	24
2.3.1.	Teste da α -amilase:	25
2.3.2.	Teste oxidase	25
2.3.3.	Identificação por micrométodos: API NE20	25
2.4.	Testes de susceptibilidade aos antibióticos	26
2.4.1	Método de difusão em disco	26
2.4.2.	Determinação da concentração mínima inibitória por E-teste	27

2.5.	Métodos moleculares	27
2.5.1.	Extracção de ADN bacteriano	27
a)	Método da fervura (boil method):	27
b)	QIAamp DNA Mini and Blood Mini <i>kit</i>	28
2.5.2.	Amplificação por reacção em cadeia de polimerase (PCR)	29
2.5.3.	Identificação de bactérias por métodos moleculares: 16s rDNA	29
2.5.3.1.	Visualização dos produtos amplificados em gel de agarose	30
2.5.3.2.	Sequenciação dos produtos amplificados	31
2.5.4.	Detecção de β -lactamases do tipo tem e shv	31
2.5.5.	Visualização em gel de agarose	32
2.6.	Extracção de ADN plasmídico	32
2.6.1.	Pelo kit Plasmid Miniprep (Jetquick)	32
2.6.2.	Plasmid or Cosmid DNA Purification - QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Kits	33
2.6.3.	Método Birnboim e Doly adaptado	34
2.7.	Conjugação	35
CAPÍTULO III		
3.	Resultados e Discussão	38
3.1.	Isolamento e identificação bacteriana	38
3.1.1.	Métodos fenotípicos	38
3.1.2.	Métodos Moleculares	39
3.2.	Testes de susceptibilidade aos antibióticos	46
3.2.1.	Método de difusão em disco	46
3.3.	Detecção das b-lactamases TEM e SHV	50
3.3.1.	Comparação dos métodos de extracção de ADN bacteriano	50
3.3.2.	Visualização em gel dos amplicões das β -lactamases: TEM e SHV	51
3.4.	Ensaio de conjugação	52
3.4.1.	Identificação pelo micrométodo API NE20	52
3.4.2.	Determinação da concentração mínima inibitória por E-teste	53

3.4.3. Visualização em gel do plasmídeo	54
3.4.4. Conjugação	55
CAPÍTULO IV	
4. Conclusões	57
CAPÍTULO V	
5. Anexos	xiii
CAPÍTULO VI	
6. Bibliografia	xiv

ÍNDICE DE FIGURAS:

Fig. 1: Esquema ilustrativo dos mecanismos da transferência horizontal de genes de resistência. Adaptado de ScienceBlogs, 2009.....	xix
Fig. 2: Gel de prova do produto amplificado 16s rDNA.....	39
Fig. 3: Imagem ilustrativa do programa utilizado para a editar a sequência das bactérias.....	40
Fig. 4: Sequência de <i>Aeromonas</i> sp., nº8 da tabela 7, proveniente do software BLAST. (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov).....	41
Fig. 5: Gel de prova do produto multiplex amplificado que compara os dois métodos de extracção de ADN.....	50
Fig. 7: Gel de prova dos produtos amplificado do PCR multiplex para os genes TEM e SHV.....	51
Fig. 2: Resultado do teste API NE 20 para <i>Aeromonas</i> nº8.....	53
Fig. 3: Concentração mínima inibitória para o trimetoprim determinada pelo E-teste para o isolado <i>Aeromonas hydrophila/caviea</i>	53
Fig. 8: Gel de prova da presença de plasmídeo em <i>Aeromonas</i> sp. do meio AMB com suplemento de ampicilina isolada de um robalo.....	54

ÍNDICE DE TABELAS:

Tabela 1: Mecanismos de acção dos antibióticos. Adaptado de Romero <i>et al.</i> 2012.....	14
Tabela 2: Principais agentes antimicrobianos utilizados em aquacultura e a sua importância na medicina humana. Adaptado de Heuer, O.E., 2009.....	18
Tabela 3: Taxa de metabolismo dos principais antimicrobianos em aquacultura. Adaptado de Regitano and Leal, 2010.....	19
Tabela 4: Origem das amostras.....	23
Tabela 5: Constituintes da reacção PCR 16s rDNA com os respectivos tamanhos esperados dos fragmentos.....	30
Tabela 6: Constituintes da reacção de PCR para detecção de genes TEM e SHV com os respectivos tamanhos esperados dos fragmentos.....	32
Tabela 7: Identificação dos isolados bacterianos pela amplificação da região 16S rDNA em relação à amostra e testes fenotípicos.....	45
Tabela 8: Antibiograma efectuado pelo método de Kirby-Bauer das bactérias identificadas por sequenciação.....	49
Tabela 9: Ocorrência e concentrações médias de resíduos dos principais antibióticos veterinários em diferentes matrizes ambientais. Adaptado de Regitano and Leal, 2010.....	xiii

ABREVIATURAS

ACVIM – American College of Veterinary Internal Medicine
ADH – L-arginina
ADN – Ácido Desoxirribonucleico
AMB – Meio Base de *Aeromonas* (*Aeromonas Medium Base*)
AML – Amoxicilina
ARA – Arabinose
AVMA – American Veterinary Medical Associations
BHA – Agar Cérebro Coração (*Brain Heart Agar*)
C – Cloranfenicol
CAP – Ácido caprato
CIT – Citrato de trisódio,
CMI – Concentração mínima inibitória
COMISA – World Federation of Animal Health Industry
CPEs - Carbapenemases
DDA – Dose diária aceitável
EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetracetic acid*)
EMB – Eosine Methylene Blue
ESBLs – β -lactamases de espectro alargado (*Extended Spectrum β -lactamases*)
ESC – Esculina
EUA – Estados Unidos da América
FAO – Food and Agriculture Organization
FDA – Food and Drugs Administration
FVE – Federação dos Veterinários da Europa
G – Relative centrifugal force (RCF)
GEL – Gelatina
GLU – Glucose
GNT – Potássio gluconato
H – Horas
H₂O – Água
I – Intermédia
IFAP – International Federation of Agricultural
LB – Luria-Bertani
MAC – MacConkey
MAL – Maltose
MAN – Manitol
MDR – Resistência a múltiplos antibióticos (*MultiDrug Resistance*)
Min – Minutos
MLT – Malato
MNE – Manose

MOPS – 3-(N-morpholino)propanesulfónico ácido
MUG - 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronida
NA – Ácido nalidixico
NaCl – Cloreto de sódio
NAG – N-acetil-Glucosamina
NaOH – Hidróxido de sódio
Nitrataze – NO₃
Nmca – Produtor de carbapenemas em enterobactérias
Nº - Número
OIE – World Organisation for Animal Health
OMS – Organização Mundial de Saúde
PAC – Ácido fenil-acetato
PA β N - Fenilalanina-arginina- β -naftilamida
PB – Pares de bases
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
pH – Potencial de hidrogénio
PNPG – 4-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
R – Resistente
rDNA – ADN recombinante
RPM – rotações por minuto
S – susceptível
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SMX – Sulfametoxazol
SXT – sulfametoxazol/ trimetoprim
TBE – Tris/ Borato/ EDTA
TE – Tetraciclina
TMP – Trimetoprim
Tris -Trisaminometano
TRP – Indol
TS – Trypticase de soja
TSB – Trypticase de soja broth
URE – Ureia
V – Volts
VTEC - *Escherichia coli* verotoxigénica
WVA – World Veterinary Association

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Muitas das doenças que causam prejuízo aos piscicultores, são provocadas por agentes infecciosos, podendo tornar a actividade pouco lucrativa (Tavechio, Guidelli and Portz, 2009). Assim sendo, há muitos anos que são utilizados compostos químicos a fim de matar ou inibir o crescimento de microrganismos, para combater a mortalidade excessiva dos peixes (Guardabassi and Kruse, 2010).

O sucesso da actividade depende da implementação de boas práticas nos sistemas de produção de peixe, como o controlo da qualidade da água, o fornecimento de uma alimentação equilibrada e de qualidade, garantindo assim a saúde dos animais e consequentemente a prevenção de doenças (Tavechio, Guidelli and Portz, 2009).

Contudo, a medicação administrada apresenta consequentes impactos sobre o meio ambiente, devido principalmente à libertação de resíduos orgânicos e inorgânicos (Read and Fernandes, 2003). Esses impactos tendem a ser mais graves, se a troca da água não for adequada, e a segurança alimentar humana corre o risco de ser directamente afectada pela presença de antibióticos residuais em peixes que foram doseados com antibióticos (Burrige *et al.*, 2010). Além disso, o consumo de antibióticos não detectados em alimentos, podem gerar problemas de alergia e toxicidade, que são difíceis de diagnosticar, devido à falta de esclarecimento na ingestão dos mesmos (Cabello, 2006). A exposição de antibióticos em concentrações sub-inibitórias pode levar ao aparecimento de resistência, quer em bactérias comensais do intestino humano, quer de bactérias dos peixes e aquáticas, com possível disseminação de genes de resistência em diversas populações bacterianas (Gordon *et al.*, 2007; Burrige *et al.*, 2010; Guardabassi and Kruse, 2010).

1.1. AQUACULTURA

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization), o termo aquacultura engloba todas as actividades relacionadas com o cultivo de organismos aquáticos; como peixes, moluscos, crustáceos, plantas aquáticas, répteis e anfíbios (Leston *et al.*, 2011). Envolve técnicas de criação e métodos de manejo. A aquacultura extensiva envolve o cultivo de pescado ou marisco, num habitat 'natural' sem qualquer suplemento alimentar e com o mínimo impacto sobre o meio ambiente. Por outro lado, a criação intensiva de peixes ósseos, envolve o fornecimento de rações de alta qualidade artificial (Read and Fernandes, 2003).

Nas últimas décadas, esta tecnologia tem contribuído significativamente para a redução da escassez global de alimentos (Heuer *et al.*, 2009), tendo uma importância reconhecida

como fonte de alimento saudável para o consumo humano. Além disso, tem proporcionado também oportunidades de emprego em diferentes partes do mundo, particularmente nos países em desenvolvimento (Leston *et al.*, 2011).

Com um crescimento acentuado da produção de peixes e canais de distribuição melhorados, o consumo tem crescido drasticamente nas últimas décadas (FAO, 2012). Em 2008, a produção de peixes em viveiro contribuiu aproximadamente com 50% da produção de peixe para alimentação em todo o mundo, sendo a China, responsável por aproximadamente 70% da produção mundial, o Japão e os demais países da região da Ásia-Pacífico, contaram com 22%. A Europa Ocidental e a América do Norte com apenas 3,5% e 1,3%, respectivamente, representam uma pequena fracção da produção mundial. Cerca de 40% da produção mundial de pescado, a maioria deriva da aquacultura, sendo negociado internacionalmente, com exportações superiores às mercadorias diárias, assim como a carne, os cereais, o açúcar e o café (Smith, P. *et al.* 2008).

Em termos percentuais, até 2008, a produção aquícola é dividida de forma aproximadamente igual, entre água marinha ou salobra (57%) e água doce (43%) e, em termos de valor, os peixes são o produto da aquacultura dominante (54%), seguidos dos crustáceos (20%) e moluscos (14%) (Smith, P. *et al.* 2008).

O consumo de peixes na alimentação aumentou uma média de 9,9 Kg (peso vivo) em 1960, para 18,4 Kg em 2009. Das 126 milhões de toneladas, disponíveis para consumo humano em 2009, o consumo de peixe era menor em África, enquanto a Ásia, foi responsável por dois terços do consumo total, com 85,4 milhões de toneladas, dos quais 42,8 milhões foram consumidos fora da China (FAO, 2012).

Os valores *per capita* de consumo de peixe correspondentes a Oceânia, América do Norte, Europa, e América Latina e do Caribe foram 24,6 Kg, 24,1 Kg, 22,0 Kg e 9,9 Kg, respectivamente. Embora o consumo anual *per capita* de produtos da pesca ter crescido nas regiões em desenvolvimento, ainda é notável a diferença para as regiões mais desenvolvidas. Uma parte considerável do peixe consumido nos países desenvolvidos consiste em importações, e, devido à demanda constante e produção doméstica em declínio, a dependência das importações, está prevista aumentar nos próximos anos (FAO, 2012).

A China, por exemplo, tem sido responsável pela maior parte do aumento de consumo de peixe no mundo. A sua participação na produção mundial de pescado cresceu de 7% em 1961 para 35% em 2010, impulsionada pelo aumento na diversidade de peixe disponível (FAO, 2012).

Os peixes e os produtos da pesca representam uma valiosa fonte de proteínas e

micronutrientes essenciais para a nutrição equilibrada e boa saúde. Em 2009, o peixe representou 16,6% do consumo na população mundial de proteína animal e de 6,5% de toda a proteína consumida. Globalmente, o peixe abastece cerca de 3,0 bilhões de pessoas, com quase 20% do seu consumo de proteína animal, e 4,3 bilhões de pessoas com cerca de 15% de proteína (FAO, 2012).

Em 2010, a pesca de captura e de aquacultura, forneceram cerca de 148 milhões de toneladas de peixe, dos quais cerca de 128 milhões de toneladas foram consumidos pelo homem, e os dados preliminares para 2011 indicam um aumento na produção de 154 milhões de toneladas, dos quais 131 milhões são destinados ao consumo (FAO, 2012).

As tendências mundiais no consumo de produtos de origem animal, mais concretamente o consumo de peixe, em todo o mundo registou um aumento de 9 Kg *per capita* por ano em 1960 e de 16,7 Kg em 2006, espera-se que este valor aumente para 17,0 Kkg em 2020 (Leston *et al.*, 2011).

Portanto, a aquacultura continua a ser o sector de maior rapidez no crescimento de animais para consumo humano (FAO, 2013).

Segundo a FAO, a aquacultura cresce mais rapidamente do que todos os outros sectores de produção de alimentos para animais. A sua contribuição para as reservas mundiais de várias espécies de peixes, crustáceos e moluscos teve um aumento de 3,9% da produção total em 1970, para 33% em 2005. Estima-se que a pesca e a aquacultura têm fornecido cerca de 110 milhões de toneladas de peixe por ano, proporcionando uma oferta per capita de 16,7 Kg (peso vivo). Desta oferta, 47% é derivado da produção aquícola (Romero, Feijóo and Navarrete, 2012).

A vasta gama de espécies cultivadas reflecte-se na diversidade dos sistemas e ambientes (Smith, P. *et al.* 2008).

No entanto, existem vários factores que influenciam a escolha de ração para peixes de viveiro. Destes, o factor económico é geralmente o mais importante. Outros factores importantes no fabrico de rações para animais aquáticos, são a estabilidade do alimento na água e a sua aceitabilidade. A inclusão de um agente de ligação é necessária para assegurar a alimentação. Podendo ser líquidos ou sólidos, revestimentos ou películas. São usados para melhorar a ração animal e para estabilizar as dietas em ambientes aquáticos. A ração para os peixes exige um nível adequado de processamento, para garantir uma boa estabilidade na água até que os animais a consumam (Muchlisin, 2012).

A indústria da aquacultura está a tornar-se cada vez mais concentrada. Porém, esta produção é dificultada pela mortalidade imprevisível, que pode ocorrer devido a interacções

negativas entre os peixes e bactérias patogénicas (Romero, Feijó and Navarrete, 2012).

A aquacultura intensiva, em condições ambientais desfavoráveis ou más práticas de gestão, podem afectar significativamente a homeostasia e levar ao *stress* fisiológico, podendo contribuir em desequilibrar o equilíbrio delicado entre o ambiente e o bem-estar do hospedeiro-patogénio (Sørum, 2006; Torrecillas and Makol, 2012). Entre os parâmetros de bem-estar, o cortisol é comumente aceite como um indicador de *stress* dos peixes. A resposta dos peixes mal-adaptados resulta na sobrecarga alostática, que afecta negativamente muitas funções fisiológicas, tais como; osmorregulação, crescimento, reprodução ou defesa imunitária e, ainda provoca alterações celulares em diversos tecidos, tais como; os do tracto gastrointestinal. Esta situação pode facilitar a indução de doenças infecciosas devido a uma translocação bacteriana (Torrecillas and Makol, 2012).

Para resolver este problema, os produtores utilizam frequentemente antibióticos no tratamento de doenças bacterianas (Romero, Feijó and Navarrete, 2012).

Uma vez que é utilizada actualmente uma grande variedade de fármacos na produção aquícola, foram introduzidas medidas de controlo. Estas incluem desinfectantes, antibióticos e agentes anti-helmínticos. Contudo, o controlo da doença é um campo de pesquisa activa, e as alternativas para os tratamentos com antibióticos, têm sido cada vez mais exploradas (Romero, Feijó and Navarrete, 2012).

1.2. FLORA MICROBIANA DOS PEIXES

O trato intestinal dos peixes tem sido investigado por vários autores, devido à sua importância assumida na nutrição, digestão e doença (Romero, Feijó and Navarrete, 2012). Oferece um nicho ecológico para o crescimento bacteriano, e a microflora presente no interior do tracto intestinal é dependente da espécie hospedeira, estirpe, crescimento ontogenético, níveis de tensão, e estrutura do intestino. O processamento de nutrientes e desenvolvimento de absorção, do sistema imune das mucosas, angiogénese e renovação epitelial são influenciados pela flora intestinal. Por conseguinte, a flora intestinal desempenha um papel significativo no estado fisiológico de um indivíduo. Uma flora alterada pode facilitar o crescimento e a sobrevivência das bactérias potencialmente patogénicas de peixes e também resultar em maturação diferente da imunidade da mucosa em peixes jovens (Cantas and Fraser, 2011; Romero, Feijó and Navarrete, 2012).

A especificidade da resposta do hospedeiro depende das espécies de bactérias que colonizam o tracto digestivo. Eventuais modificações na flora gastrointestinal, devido ao tratamento com antibióticos podem alterar presumivelmente a relação benéfica hospedeiro-

parasita. Portanto, entender como compostos antibacterianos modificam a flora gastrointestinal dos peixes, pode ajudar a melhorar a gestão dos sistemas de produção a fim de reduzir o uso de antibióticos e aumentar a segurança dos peixes de cultivo. No entanto, poucos estudos se têm centrado na determinação dos efeitos do tratamento com antibiótico sobre a ecologia microbiana do intestino de peixes. Em geral, estes descrevem essencialmente a frequência na resistência a antibióticos, durante e após a utilização dos mesmos, a susceptibilidade dos agentes patogênicos isolados a partir de peixe e determinantes moleculares da resistência aos antibióticos (Romero, Feijó and Navarrete, 2012).

Sistemas de monitorização de resistência destinados a resolver problemas de saúde, principalmente humana, normalmente incluem bactérias zoonóticas enteropatogênicas ou comensais. Todas estas bactérias podem ser encontradas no trato gastrointestinal de uma ou mais espécies de animais de produção. Podem contaminar os alimentos de origem animal (McEwen, M. and David, 2006), e a adição de antibióticos acelera a taxa de desenvolvimento de resistência em seres humanos (Lees and Shojaee Aliabadi, 2002).

As bactérias zoonóticas são directamente perigosas para a saúde humana e a resistência antimicrobiana dessas espécies podem aumentar a carga de doença no homem, devido a uma variedade de mecanismos, como o aumento da frequência, a duração e severidade da infecção. No entanto, as bactérias comensais podem funcionar como um reservatório de genes de resistência podendo transferir a sua resistência para bactérias patogênicas (Aarestrup, 2006; McEwen, M. and David, 2006).

1.2.1. AEROMONAS SP.

Até 1984, apenas quatro espécies de *Aeromonas* sp. eram conhecidas, *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* (actualmente *A. veronii* biovar *sobria*) e *A. salmonicida*. Desde então, o género *Aeromonas* evoluiu com a adição de novas espécies e a reclassificação de taxa existente, anteriormente colocadas em conjunto com *Vibrio* sp. e *Plesiomonas* na família *Vibrionaceae*. No entanto, estudos genéticos forneceram evidências suficientes para apoiar a colocação numa família própria, *Aeromonadaceae* (Ghenghesh and Ahmed, 2008).

Os membros do género *Aeromonas* são encontrados em diversos habitats, incluindo solo e água e são patogêneos de animais de sangue frio, como os peixes (Deodhar, Saraswathi and Varudkar, 1991; Cantas, Midtlyng and Sørum, 2012) mas podem, raramente, estar associados a infecção no Homem (Deodhar *et al.* 1991; Sørum 2006; Ghenghesh and Ahmed

2008). Aparecem naturalmente em água doce, rios, regos e lagos de água, esgoto bruto, esgoto tratado, lama activada e água municipal potável tratada com cloro. São facilmente isoladas em águas estuarinas e de praias, mas não em mar profundo. Porém, estes organismos aparecem em água de salinidade muito elevada, fontes geotérmicas ou rios extremamente poluídos. Algumas espécies de *Aeromonas* sp. são resistentes às concentrações de cloro usuais em água purificada para consumo (Ghenghesh and Ahmed, 2008).

A grande diversidade de habitat pode ser claramente vista pela espécie citotóxica e hemolítica isolada recentemente de *A. caviae*. A temperatura de crescimento de *Aeromonas* sp. varia de 12° a 43°C, com crescimento óptimo a 30°C. A sua motilidade vai de uma faixa de temperatura entre 0° e 45°C para algumas espécies, com faixa de temperatura óptima de 22° a 35°C com pH alcalino (pH óptimo 5,5-9,0), um carácter utilizado no meio de enriquecimento alcalino-peptona (pH 8,5-9,0) para o isolamento de espécies de *Aeromonas* a partir de fezes e de outras amostras ricas em bactérias entéricas (Ghenghesh and Ahmed, 2008).

Os membros do género *Aeromonas* são Gram-negativos de aproximadamente 0,3 – 1,0 µm em diâmetro por 1,0 – 3,5 µm em comprimento, anaeróbios facultativos, catalase e oxidase-positivas, em forma de bastonete, não produzem esporos e não apresentam cápsula (Rogol and Sechter 1979; Ghenghesh and Ahmed 2008; Barcellos *et al.* 2008; Cantas *et al.* 2012). Possuem geralmente um único flagelo polar, no entanto, os flagelos laterais e peritricos podem ser formados por algumas espécies. Produzem várias enzimas hidrolíticas como amilase, desoxirribonuclease, elastase, e lipase (Ghenghesh and Ahmed, 2008).

A virulência de *Aeromonas* é multifactorial, e não totalmente esclarecida. A enteropatogenicidade tem sido atribuída à produção de exotoxinas elaboradas (hemolisinas, citotoxinas, enterotoxinas), hemaglutininas e adesinas (Deodhar *et al.* 1991; Handfield *et al.* 1996; Ghenghesh and Ahmed 2008; Pablos *et al.* 2009).

Muitas espécies têm sido implicadas em doenças de peixes, incluindo *A. hydrophila*, *A. veronii biovar sobria*, *A. allosaccharophila*, e *A. salmonicida*. Destes, *A. hydrophila*, *A. sobria veronii biovar*, *A. jandaei*, *A. schubertii* e *A. caviae* são mais comumente implicadas em infecções humanas intestinais. Vários relatórios têm indicado espécies de *Aeromonas* como causa de gastroenterites em crianças e adultos, e estão cada vez mais a ser isolados a partir de pacientes com diarreia do viajante (Deodhar *et al.* 1991; Sørum 2006; Ghenghesh and Ahmed 2008).

Aeromonas hydrophila pode causar septicémia e mortalidade em peixes de água doce

temperada ou quente, em todo o mundo. É também um importante patógeno em peixes ornamentais e animais de estimação. Foi isolada no Homem, em casos de gastroenterites, infecções do trato urinário, osteomielite, septicemia, meningite e infecções de feridas (Rogol and Sechter 1979; Barcellos et al. 2008; Pablos et al. 2009).

Existem evidências epidemiológicas e moleculares que demonstram que os patógenos de peixes, tais como *Aeromonas*, podem transmitir e partilhar genes de resistência a antibióticos com outros agentes patogénicos (Jacobs and Chenia, 2007; Cantas, Midtlyng and Sørnum, 2012) tais como *Escherichia coli* isoladas a partir de seres humanos (Cabello, 2006). Além disso, a prova de expressão de citotoxinas semelhantes à shiga-toxina de *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC) em plasmídeos de *Aeromonas* sp. tem sido observada (Pablos et al., 2009).

Há um aumento da incidência de resistência antimicrobiana de *Aeromonas* spp isoladas em ambientes de aquacultura (Jacobs and Chenia, 2007). O primeiro relatório nos Estados Unidos, em 1959, sobre resistência adquirida antibacteriana, em trutas tratadas com sulfatiazol e tetraciclina, deu positivo para *Aeromonas salmonicida*. Esta espécie causa doenças em peixes de regiões temperadas e frias (Sørnum, 2006; Ghenghesh and Ahmed, 2008). A subespécie *salmonicida* causa furunculose em peixes salmonídeos, enquanto outras subespécies, também conhecidas como estirpes atípicas, causam septicemia e infecções na pele, músculos, vários órgãos e várias outras espécies de peixe marinhos (Sørnum, 2006).

A resistência intrínseca deste género a β -lactâmicos pode surgir a partir da expressão cromossómica de β -lactamases e/ou bombas de efluxo. Beta-lactamases que conferem resistência aos β -lactâmicos de espectro estreito (penicilinas e cefalosporinas de primeira geração), tais como, enzimas tipo-OXA e penicilinas TEM-I e SHV-I, foram identificadas no género, bem como β -lactamases de espectro estendido (ESBL), como TEM-24 (Picão et al. 2008; Carvalho et al. 2012). Além disso, a metalo- β -lactamase CPhA/imiS, e os genes *tet*, têm sido envolvidos na resistência a carbapenemos e tetraciclinas, respectivamente. Por outro lado, outros genes *bla* clinicamente relevantes, genes que codificam resistência a β -lactâmicos, embora não sejam geralmente detectados em *Aeromonas*, representam determinantes de resistência importantes, e foram encontrados ocasionalmente entre estirpes clínicas de *Aeromonas* sp. e também em isolados não-clínicos recuperados de ambientes aquáticos, e de animais de aquacultura (Carvalho et al., 2012).

Foi observada a multirresistência (MDR), ou seja, resistência a antibióticos pertencentes a pelo menos três categorias, associadas a bombas de efluxo. Estes sistemas são conhecidos por desempenhar um papel importante na resistência aos antibióticos de vários bacilos

Gram-negativos ambientais que se comportam como agentes patogénicos oportunistas (Hernould *et al.*, 2008).

A capacidade de transferência horizontal de genes tem sido também documentada, Por exemplo, num estudo dinamarquês, três isolados de *A. salmonicida* resistentes transferiram o seu plasmídeo R com resistência à oxitetraciclina, sulfonamidas, trimetoprim e estreptomicina para *E.coli* (Sørum, 2006).

A alta incidência de resistência a cefalosporinas de terceira geração e fluoroquinolonas é encontrada em *Aeromonas* isoladas a partir de fontes clínicas em alguns países em desenvolvimento da Ásia (Ghenghesh and Ahmed, 2008).

Em Espanha, os dados do Centro Nacional de Epidemiologia indicam que o género *Aeromonas* ocupou o quarto lugar entre as causas de doenças gastrointestinais totais relatadas a cada ano durante o período de 1997 a 2006 (Pablos *et al.*, 2009).

Um estudo de 2001 com a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) no norte de Portugal, com lesões causadas predominantemente por *A. hydrophila*, apresentava resistência a β -lactâmicos, incluindo imipenem. No entanto, o nível de resistência contra antibióticos β -lactâmicos entre os isolados de *A. hydrophila* foi inferior a muitos isolados de infecções clínicas humanas (Sørum, 2006).

1.2.1. ENTEROBACTERIACEAE

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* (que incluem *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, *Salmonella* spp. *Citrobacter* spp., entre outras (Lynch, Clark and Zhanel, 2013) são Gram-negativas anaeróbias facultativas, em forma de bastonete, catalase positiva e oxidase negativa, não produzem esporos e são fermentadores de glicose (Bergey *et al.*, 1957).

São patogénicos oportunistas importantes que podem causar doença intestinal e sistémica nos seres humanos e outros animais (Freny *et al.* 1988; Sabat *et al.* 2000; Stone *et al.* 2007). São habitantes da flora intestinal, e estão entre os mais comuns agentes patogénicos oportunistas, causando infecções, tais como cistite e pielonefrite com febre, septicemia, pneumonia, peritonite, colangite, meningite e várias infecções intra-abdominais (Paterson, 2006; Nordmann, Naas and Poirel, 2011).

Dentro desta família, *Escherichia coli* é uma causa frequente de infecções do trato urinário, e pode por vezes, adquirir plasmídeos conjugativos, que podem ser transferidos entre bactérias entéricas (EFSA and ECDC, 2013). *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. são

causas importantes de pneumonia. *Salmonella entérica* provoca gastroenterite e, em alguns pacientes, uma infecção invasiva (Paterson, 2006).

A resistência aos antibióticos é um problema emergente em *Enterobacteriaceae*. A resistência relacionada com ESBLs é um problema particular devido ao espectro alargado destas enzimas, que inactivam grande parte dos antibióticos β -lactâmicos, complicando o tratamento de infecções, mas muitos outros mecanismos de resistência estão presentes nesta família, conduzindo a resistência a múltiplos antibióticos (Paterson, 2006).

Desde 2000, a disseminação adquirida a nível hospitalar e comunitário de enterobactérias, que produzem ESBLs capazes de hidrolisar quase todas as cefalosporinas, e de carbapenemases (CPEs), tem sido relatada em todo o mundo. *Enterobacteriaceae* resistentes ao carbapenem têm sido relatadas como consequência, principalmente de aquisição de genes que codificam carbapenemases (Nordmann, Naas and Poirel, 2011).

Recentemente, estirpes produtoras de ESBLs, em especial *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.*, surgiram como importantes patógenos humanos resistentes a antibióticos em todo o mundo devido à produção da ESBL tipo CTX-M (Jiang *et al.* 2012; Renata C Picão *et al.* 2013). Portugal é um dos países europeus com maiores taxas de produtores de ESBL na clínica, com uma mudança de variantes TEM ou SHV para tipos-CTX-M, desde 2003. A propagação de bactérias multirresistentes, incluindo produtores de ESBL, nos hospitais, animais saudáveis produtores de alimentos, produtos alimentícios e aquáticos, tem sido descrita (Mendonça *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2013).

A qualidade microbiana do peixe tilápia foi estudada em 2005, mostrando que todas as amostras de tecido, com excepção dos tecidos musculares foram contaminadas com coliformes fecais. *Escherichia coli* era o contaminante mais comum e encontrado em número elevado (Yagoub, 2009). A presença desta espécie em água ou alimentos é um indicador de contaminação fecal e exposição dos consumidores para microorganismos potencialmente patogénicos. Enquanto a maioria das estirpes são inofensivas para o homem, outras são virulentas e podem ser fatais (Vieira *et al.*, 2010). Disseminam-se facilmente (por contacto directo, alimentos e água contaminados) e adquirem material genético através de transferência horizontal de genes, mediada principalmente por plasmídeos e transposões (Nordmann *et al.* 2011; Lynch *et al.* 2013).

O consumo de água contaminada com material fecal é uma importante via de exposição, e de acordo com o regulamento 2073/2005, a família *Enterobacteriaceae* pode ser utilizada na monitorização de rotina e, caso estes microrganismos estejam presentes, podem efectuar-se testes para detecção de agentes patogénicos específicos. (Sabat *et al.* 2000; "Regulamento

(CE) N.º 2073/2005” 2005).

1.3. USO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS EM PEIXES

Agentes antimicrobianos podem ser definidos como moléculas que têm a capacidade de matar ou inibir o crescimento de microorganismos (Read & Fernandes 2003; Gordon *et al.* 2007; BurrIDGE *et al.* 2010). Podem ser produzidos por microorganismos como fungos e bactérias, ou de forma sintética ou semi-sintética (Guardabassi and Kruse, 2010; Romero *et al.* 2012)

Depois da descoberta da penicilina, por Fleming em 1928, os antibióticos tornaram-se medicamentos essenciais para a saúde humana e animal, e bem-estar. Devem ser seguros (não tóxicos) para o hospedeiro, permitindo a sua utilização como agentes quimioterapêuticos para o tratamento de doenças infecciosas bacterianas. Em adição à sua utilização na medicina humana, os agentes antimicrobianos são também usados em animais de produção e de aquacultura, podendo ser categorizados como terapêuticos, profiláticos ou metafiláticos. A utilização terapêutica corresponde ao tratamento de infecções estabelecidas. Profilático significa a utilização de agentes antimicrobianos como forma de prevenção em indivíduos ou grupos para impedir o desenvolvimento de infecções. Metafilático é um termo usado para o procedimento em que o grupo de medicamentos que visa tratar os animais doentes, simultaneamente trata os outros do grupo para evitar que a doença se propague (Romero, Feijoó and Navarrete, 2012).

Em aquacultura, são frequentemente administrados, por curtos períodos de tempo, antibióticos a níveis terapêuticos por via oral, (Romero, Feijoó and Navarrete, 2012; Sørnum, 2006) à exceção de alguns casos de peixes reprodutores, tratados com injeções intraperitoneais de antibióticos. No entanto, os peixes marinhos, devido ao teor de sais da água do mar, devem ter maior quantidade de antibióticos ao seu dispor para assegurar um nível suficiente de moléculas de fármacos activas (Sørnum, 2006).

Os peixes doentes não obtêm níveis óptimos dos fármacos nos tecidos do corpo por causa da perda de apetite, enquanto os saudáveis são capazes de ganhar níveis mais elevados de medicamentos administrados (Sørnum, 2006).

Uma característica distinta nesta indústria é o número muito limitado de agentes antimicrobianos possíveis de serem utilizados (Smith, P. *et al.* 2008). Todos os fármacos legalmente utilizados na aquacultura devem ser aprovados pelo órgão governamental responsável pela medicina veterinária. Nos EUA, os seguintes agentes antimicrobianos estão

autorizados pela FDA para uso na aquacultura: oxitetraciclina, florfenicol, e sulfadimetoxina/ormetoprim. Estas agências reguladoras podem definir regras para o uso de antibióticos, incluindo rotas admissíveis de entrega, formas de dosagem, tempos de abstinência, tolerâncias e uso, incluindo taxas de dose e limitações. Por exemplo, na Noruega, o uso de agentes antimicrobianos requer prescrição de um veterinário, e, por conseguinte, a sua utilização é terapêutica. São vendidos em farmácias ou em fábricas de ração autorizadas pela Agência de Medicamentos da Noruega. É obrigatório informar a quantidade de antibióticos utilizados e manter os registros de prescrições (OIE 2007; Romero *et al.* 2012).

Em muitos países, as várias legislações em vigor, no intuito de proibirem, nas rações a adição de antibióticos utilizados em clínica humana, assim como, na definição das quantidades autorizadas de antibióticos, deverão ser acompanhadas de medidas de vigilância e de controlo rigoroso (Romero, Feijoó and Navarrete, 2012).

Em relação a 25 países europeus, o número médio de antimicrobianos regulamentados para uso em aquacultura é actualmente de $2 \pm 1,2$. Em países com uma infra-estrutura científica menos desenvolvida, as regulamentações são fracamente aplicadas (Smith, P. *et al.* 2008).

A escolha dos antibióticos usados em aquacultura é complicada pela ausência de regime terapêutico padronizado e pela falta de dados sobre a eficácia clínica de quaisquer terapias. Na prática, a escolha do agente terapêutico é frequentemente influenciada tanto por considerações de disponibilidade do agente, como pelos regulamentos e susceptibilidade bacteriana e por considerações da natureza da doença a ser tratada (Smith, P. *et al.* 2008).

Os níveis actuais de antimicrobianos usados na aquacultura mundial não são fáceis de determinar porque, diferentes países têm distribuição diferente e sistemas de registro próprios (Romero, Feijoó and Navarrete, 2012). As diversidades entre espécies aquícolas e ambientes aquáticos de cultivo e de tecnologias são muito maiores do que para os animais terrestres (Smith, P. *et al.* 2008).

Na aquacultura comercial, a terapêutica antimicrobiana é mais comumente aplicada na produção de peixes e crustáceos. Em sistemas de cultivo de moluscos, a utilização de agentes antimicrobianos é quase confinada às primeiras fases larvais de produção, e as quantidades utilizadas são, por conseguinte, relativamente pequenas. Já em peixes ornamentais, a utilização de antimicrobianos é em grande parte não regulamentada e raramente tem sido quantificada, mas pensa-se ser considerável, e a importância desta utilização é aumentada pela proximidade destes com os seres humanos (Smith, P. *et al.* 2008).

Os sistemas de produção modernos favorecem um melhor controlo de doenças, devido à melhoria de condições higiénicas. No entanto, tornam os animais mais vulneráveis a doenças devido à sua elevada densidade e condições de *stress* a que estão submetidos (Guardabassi and Kruse, [s.d.]). Estas doenças são provocadas por dinoflagelados, protozoários, mixosporídeos, monogenéticos e crustáceos, além de fungos, bactérias e vírus (Tavecchio, Guidelli and Portz, 2009). Devido a este facto, houve um acréscimo da utilização de agentes antimicrobianos (Romero, Feijoó and Navarrete, 2012).

A terapia antimicrobiana actua através da redução do impacto de uma bactéria sobre a saúde do hospedeiro. O objectivo de qualquer diagnóstico não deve ser apenas a detecção da bactéria em particular, mas também, e de maneira crítica, uma avaliação do seu papel no desenvolvimento da doença (Smith, P. *et al.* 2008).

Do ponto de vista clínico, deve-se ter em conta: a eficácia clínica, a toxicidade para o hospedeiro, o risco de desenvolvimento de resistência e os efeitos adversos sobre a flora microbiana (Guardabassi and Kruse, 2010).

A administração de antibióticos para tratar infecções associadas a bactérias clinicamente resistentes podem não beneficiar o animal infectado e pode ter somente impactos negativos. Nos últimos anos, alguns progressos foram feitos no desenvolvimento de métodos padronizados para determinar a susceptibilidade *in vitro* de bactérias associadas com a doença dos animais aquáticos. O uso de antimicrobianos deve, portanto, ser sempre acompanhado pelos dados de susceptibilidade da bactéria alvo (Smith, P. *et al.* 2008).

As vacinas foram desenvolvidas para algumas doenças em peixes. A utilização de algumas destas vacinas foi indicada como papel importante na redução da infecção. No entanto, os crustáceos carecem de um sistema imune adaptativo e, por isso, as vacinas não fornecem um método de redução da utilização de antibióticos (Smith, P. *et al.* 2008).

As duas vias mais comuns de administração, são a utilização de rações medicadas e a adição directamente na água (terapia de imersão), e ambos os métodos implicam o tratamento efectivo dos animais (Heuer *et al.*, 2009; Romero, Feijoó and Navarrete, 2012). Porém, os peixes não metabolizam alguns antibióticos e transportam-nos directamente para o ambiente nas fezes. Estima-se que 75% dos antibióticos utilizados na alimentação dos peixes são excretados na água (Romero, Feijoó and Navarrete, 2012).

A administração é normalmente feita pela medicação da ração, embora algumas criações possam ser tratadas individualmente, por injeções ou imersões. Numa destas situações, o sucesso de qualquer terapia antimicrobiana será em função da escolha do agente mais adequado (Smith, P. *et al.* 2008).

1.4. AGENTES ANTIBACTERIANOS – MECANISMOS DE ACÇÃO

Os antibióticos podem afectar indirectamente a biodiversidade das comunidades de fitoplâncton e zooplâncton, a saúde dos animais e dos seres humanos, e são potencialmente prejudiciais para a indústria de aquacultura (BurrIDGE *et al.*, 2010).

Citando o Decreto-Lei n.º 314/2009, *um medicamento veterinário é toda a substância, ou associação de substâncias, apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em animais ou dos seus sintomas, ou que possa ser utilizada ou administrada no animal com vista a estabelecer um diagnóstico médico-veterinário ou, exercendo uma acção farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas (Decreto-lei n.º 314/2009, 2009).*

Os antibióticos utilizados na medicina veterinária, podem ter diferentes tipos de estruturas químicas, e actuam em diferentes locais da célula bacteriana (BurrIDGE *et al.*, 2010). Em geral, os antibióticos podem apresentar: (Romero, Feijó and Navarrete, 2012):

i. Um efeito bactericida, isto é, o antibiótico mata as bactérias, por interferir com a formação, quer da parede celular da bactéria, quer dos seus conteúdos celulares. Exemplos incluem a penicilina, quinolonas e metronidazol (Romero, Feijó and Navarrete, 2012);

ii. Um efeito bacteriostático, ou seja, o antibiótico impede que as bactérias se multipliquem, interferindo com a produção de proteína bacteriana, a replicação de ADN, ou outros aspectos do metabolismo celular. São exemplos; tetraciclina, sulfonamidas, cloranfenicol, e macrólidos (Romero, Feijó and Navarrete, 2012).

Os mecanismos de acção dos antibióticos encontram-se discriminados na tabela I (Romero, Feijó and Navarrete, 2012).

Alguns dos antibióticos que inibem a síntese da parede celular bacteriana incluem beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas) e glicopeptídeos. Bloqueiam a síntese da parede celular bacteriana, interferindo com as enzimas necessárias para a síntese da camada de peptidoglicano. Em contraste, vancomicina e teicoplanina actuam através da ligação de terminais da D-alanina a cadeias de peptidoglicanos, impedindo assim a ligação cruzada necessária para a síntese da parede celular (Romero, Feijó and Navarrete, 2012).

Os antibióticos que actuam, inibindo a síntese de proteínas incluem macrólidos, aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol. Estes, aproveitam as diferenças estruturais entre os ribossomas bacterianos e eucarióticos para inibir selectivamente o crescimento de bactérias (Romero, Feijó and Navarrete, 2012).

Macrólidos, aminoglicosídeos e tetraciclinas ligam-se à subunidade 30S do ribossoma, ao passo que o cloranfenicol se liga à subunidade 50S (Pato 1989; Stratton IV 1996; Romero et al. 2012).

Fluoroquinolonas exercem os seus efeitos antibacterianos, interrompendo a síntese do ADN e causando quebras letais na dupla cadeia de ADN durante a sua replicação (Kocsis et al., 2013). Sulfonamidas e trimetoprim (TMP) inibem a síntese do ADN. A combinação do fármaco antibacteriano comum TMP, um análogo do ácido fólico, com sulfametoxazol (SMX), uma sulfonamida, inibem dois passos na via enzimática para a síntese do folato bacteriano. Por exemplo, a sulfadimetoxina é uma sulfonamida de acção prolongada e o ormetoprim é estruturalmente relacionado com TMP. Estes antibióticos agem em sinergia, bloqueiam dois passos sequenciais na síntese do ácido fólico (Pato 1989; Stratton IV 1996; Romero et al. 2012).

As polimixinas acumulam-se na membrana da célula bacteriana e exercem efeitos inibitórios por aumento da permeabilidade da membrana bacteriana. A daptomicina aparentemente insere sua cauda lipídica na membrana celular das bactérias, causando a despolarização da membrana e, eventualmente, a morte da bactéria (Pato 1989; Stratton IV 1996; Romero et al. 2012).

Tabela I: Mecanismos de acção dos antibióticos. Adaptado de Romero et al. 2012.

Mechanisms of action of antibacterial agents		Examples of antibacterial agents
Interference with cell wall synthesis	β-lactams	Cephalosporins, carbapenems, monobactams
	Glycopeptides	Vancomycin, teicoplanin
Protein synthesis inhibition	Bind to 50S ribosomal subunit	Macrolides, chloramphenicol, clindamycin, linezolid, quinupristin-dalfopristin
	Bind to 30S ribosomal subunit	Aminoglycosides, tetracyclines
Interference with nucleic acid synthesis	Bind to bacterial isoleucyl-tRNA synthetase	Mupirocin
	Inhibit DNA synthesis	Fluoroquinolones
	Inhibit DNA synthesis	Rifampin
Inhibition of metabolic pathway		Sulfonamides, folic acid analogues
Disruption of bacterial membrane structure		Polymyxins, daptomycin

1.5. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

O uso de antimicrobianos em aquacultura fornece as condições para o aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos. As bactérias com variantes mais resistentes são mais prováveis de aparecer associadas a doenças características de peixes. Os antimicrobianos são cada vez mais usados, deixando de ser viáveis. Esse feedback negativo fornece razões fortes para a ponderação da sua rotina. O uso irracional ou excessivo de qualquer agente terá um impacto directo sobre o seu valor terapêutico futuro (Smith, P. *et al.* 2008).

A possibilidade do uso de antimicrobianos na aquacultura ter um impacto sobre o tratamento de infecções em humanos e outros animais terrestres, foi levantada pela primeira vez há cerca de 40 anos (Smith, P. *et al.* 2008).

Os riscos relevantes para a saúde pública relacionados com o uso de antimicrobianos na aquacultura incluem o desenvolvimento de resistência, e disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos e genes de resistência, e a presença de resíduos de antimicrobianos nos peixes e meio ambiente podem ser transferidos para humanos através da cadeia alimentar (Smith, P. *et al.* 2008; Romero, Feijoó, and Navarrete 2012).

O recente grupo da OMS/FAO/OIE identificou os principais riscos para a saúde humana associados ao uso de antimicrobianos de aquacultura como sendo aqueles decorrentes do aparecimento de resistências transferíveis nas bactérias associadas a doenças de peixes e em ambientes de aquacultura. Recomendam que o aparecimento de tais resistências transferíveis deve ser regularmente monitorado (Smith, P. *et al.* 2008).

Esses regulamentos, particularmente aqueles que regem o comércio internacional, têm estimulado rápidas melhorias na capacidade de muitos países detectarem e monitorizarem os resíduos de antibióticos. A introdução de testes de resíduos também teve um grande impacto sobre o uso de antibióticos (Smith, P. *et al.* 2008).

Os mecanismos de resistência aos antibióticos incluem: a inactivação do antibiótico por síntese de enzimas (por exemplo, β -lactamases); a diminuição da concentração intracelular (por redução da permeabilidade da membrana externa em Gram-negativos ou bombas de efluxo); e a alteração do local activo (Nested *et al.*, 1998).

A resistência intrínseca, decorre de um factor estrutural ou funcional, associado a espécies bacterianas, um género ou mesmo um grande grupo. A resistência adquirida decorre de alterações genéticas no genoma bacteriano, as quais podem ser uma consequência de mutações ao acaso em genes próprios ou aquisição horizontal de genes exógenos, como transposões (sequências de ADN celulares que podem ser transferidos a partir de uma bactéria para outra, sem um plasmídeo intermediário (Aarestrup, 2006) e

plasmídeos (ADN extra cromossómico que se replica de um modo autónomo controlado, variando normalmente entre 300bp para 2.400 kb (Aarestrup, 2006; Cabello 2006; Aarestrup 2006; Burrige *et al.* 2010; Marshall and Levy 2011). As contribuições mais importantes para a transferência horizontal de genes em bactérias são elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposões integrões, fagos, ilhas genómicas, e integrando elementos conjuntivos (Rodríguez-Blanco, 2012).

Análises de sequências de genoma total de diferentes espécies bacterianas têm indicado que grande parte do genoma bacteriano resulta da transferência horizontal de genes (Aarestrup, 2006). A transferência horizontal de genes ocorre por três mecanismos: conjugação, transformação e transdução (Fig.1).

A transformação inicia quando as paredes celulares das bactérias são rompidas, e o ADN cromossómico circular se divide em cerca de cem unidades, cada um das quais constituídos por cerca de vinte genes. Este ADN pode passar através da célula e pode ser integrado no cromossoma da célula receptora (Nested *et al.*, 1998; Romero, Feijoó and Navarrete, 2012).

A conjugação requer o contacto entre células doadoras e receptoras. O ADN é transferido apenas numa direcção, a partir da célula dadora para a receptora. Na situação mais comum, o dador contém um tipo especial de plasmídeo (Aarestrup, 2006; Nested *et al.*, 1998; Romero, Feijoó and Navarrete, 2012). Este plasmídeo é designado como plasmídeo F (fertilidade). As células dadoras só são capazes de transferir o seu plasmídeo F e não o seu cromossoma. Transportam a informação genética e informação adicional necessárias para a transferência de ADN para a síntese dos pili do organelo que liga à célula receptora. Com alguns minutos de contacto, o plasmídeo F entra na célula receptora (Nested *et al.* 1998).

É chamado mecanismo de transdução, quando um vírus bacteriano chamado bacteriófago (ou simplesmente fago) pode transferir genes de uma bactéria para outra (Nested *et al.*, 1998). Esta alternativa tem potencial para desempenhar um papel importante na transferência de resistência devido às elevadas concentrações de vírus (bacteriófagos) em habitats aquáticos, de água do mar e sedimentos marinhos (Romero, Feijoó and Navarrete, 2012).

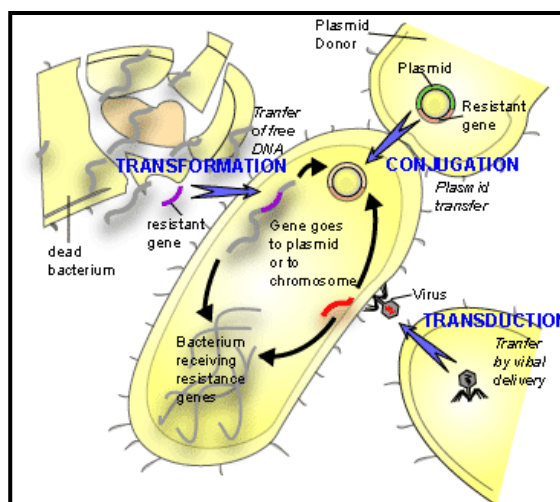


Fig. 1: Esquema ilustrativo dos mecanismos da transferência horizontal de genes de resistência. Adaptado de ScienceBlogs, 2009

Independentemente da forma como a resistência é adquirida, o uso de agentes antimicrobianos cria condições adequadas para a emergência e a disseminação de bactérias resistentes (Guardabassi and Kruse, 2010).

Esta disseminação ocorre como consequência da transferência horizontal mediada por um conjunto diversificado de elementos de ADN móveis, como plasmídeos, transposões, ilhas genómicas, integrões, bem como, a transformação natural (Aarestrup, 2006).

A transmissão do animal para o homem pode ocorrer por vários meios, incluindo adições em alimentos e água, bem como contacto directo com animais e fezes (Jacobs and Chenia, 2007; Marshall and Levy, 2011; Read and Fernandes, 2003).

1.6. CONSEQUÊNCIA DA TRANSFERÊNCIA DE ANTIMICROBIANOS PARA O HOMEM

As bactérias resistentes podem disseminar-se por fronteiras geográficas através do movimento de pessoas, ou serem transferidas para os seres humanos através de feridas, ou pela exposição obtida após o manuseamento de peixe, contacto com animais terrestres, e cadeia alimentar (Cabello 2006; Aarestrup 2006; Jacobs and Chenia 2007; Burr ridge et al. 2010).

Isso implica que o uso de antimicrobianos em animais tenha consequências para a situação da resistência em humanos, e os problemas de resistência num país podem-se expandir para outros (Guardabassi and Kruse, 2010). Podem estar expostos a bactérias resistentes através do contacto com animais ou consumo de produtos (Marshall and Levy, 2011), libertação de substâncias activas das moléculas em ecossistemas aquáticos (Gordon et al., 2007) e de uma quantidade significativa da substância original, não metabolizada, através

da urina ou fezes (Hirsch *et al.*, 1999).

A Tabela 2 resume os principais agentes antimicrobianos utilizados na aquacultura mundial e a sua importância na medicina humana. Assim, entre os agentes antimicrobianos comumente utilizados em aquacultura, vários são classificados pela OMS como criticamente importantes para utilização em medicina humana. A resistência aos antibióticos limita severamente as opções em medicina humana, e, portanto, a utilização destes agentes em animais devem ser evitada ou controlada a fim de prevenir a propagação de resistência a drogas (Heuer *et al.*, 2009; Regitano and Leal, 2010).

Tabela 2: Principais agentes antimicrobianos utilizados em aquacultura e a sua importância na medicina humana. Adaptado de Heuer, O.E., 2009.

Antimicrobial agent (drug Class)	Route of administration in aquaculture	Importance of antimicrobial class in human medicine
Amoxicillin (aminopenicillins)	Oral	Critically important
Ampicillin (aminopenicillins)	Oral	Critically important
Chloramphenicol (amphenicols)	Oral/bath/injection	Important
Florfenicol (amphenicols)	Oral	Important
Erythromycin (macrolides)	Oral/bath/injection	Critically important
Streptomycin, neomycin (aminoglycosides)	Bath	Critically important
Furazolidone (nitrofurans)	Oral/Bath	Important
Nitrofurantoin (nitrofurans)	Oral	Important
Oxolinic acid (quinolones)	Oral	Critically important
Enrofloxacin (fluoroquinolones)	Oral, bath	Critically important
Flumequine (fluoroquinolones)	Oral	Critically important
Oxytetracycline, chlortetracycline, tetracycline (tetracyclines)	Oral/bath/injection	Highly important
Sulphonamides (sulphonamides)	Oral	Important

O efeito tóxico que os antibióticos causa nos peixes também pode acumular resíduos na musculatura, oferecendo um potencial risco para o consumidor (Hirsch *et al.*, 1999; Tavechio, Guidelli and Portz, 2009; Leston *et al.*, 2011; Marshall and Levy, 2011).

No que refere ao homem, há poucos relatos de reações adversas a antibióticos nos produtos de aquacultura. Existem regulamentos, significativos relativos à presença de tais resíduos (Smith, P. *et al.* 2008).

Segundo o regulamento estes limites baseiam-se *no tipo e quantidade de resíduos que se considera não apresentarem qualquer risco de toxicidade para a saúde humana nos termos expressos pela dose diária aceitável (DDA) ou com base numa DDA temporária com um factor de*

segurança adicional. Atende também a outros riscos pertinentes para a saúde pública, bem como a aspectos de tecnologia alimentar (Regulamento (CEE) n.º 2377/90, 2009).

A quantidade de antibióticos excretados varia com o tipo de substância, dosagem, espécie e idade animal, entre outros factores. Mesmo quando a molécula é em grande parte metabolizada, alguns dos produtos de degradação excretados podem permanecer bioactivos (Regitano and Leal, 2010).

Como podemos visualizar na tabela 3, as tetraciclínas e os macrolídeos apresentam baixa taxa de metabolização (< 20% da dose administrada), enquanto as lincosamidas, as fluoroquinolonas e as sulfonamidas apresentam moderada a elevada taxa de metabolização (> 20% da dose). Já os aminoglicosídeos têm comportamento bastante variável (Regitano and Leal, 2010).

Tabela 3: Taxa de metabolismo dos principais antimicrobianos em aquacultura. Adaptado de Regitano and Leal, 2010.

Pharmacological group	Rate of metabolism in the animal body
Tetracyclines	Low
Macrolides	Low
Aminoglycosides	Low to high
Lincosamides	Moderate
Fluoroquinolones	Moderate to high
Sulfonamides	High
Low: <20%; Moderate: from 20 to 80%; High: >80% of the dose administered.	

A fim de minimizar o possível impacto do uso de antimicrobianos em animais sobre a saúde pública e animal, várias organizações internacionais, como a OMS, a World Organization for Animal Health, a FAO e a Comissão da União Europeia, nos últimos anos têm dado importância à utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais, não só para salvaguardar a eficácia dos antibióticos em medicina veterinária, mas, mais ainda, para evitar o aparecimento e a disseminação de fenótipos resistentes indesejáveis em patogénios zoonóticos, bem como a transmissão entre animais e humanos, e tem sido reconhecida pelas associações profissionais como a Associação Mundial de Veterinária (WVA), a Federação Internacional dos Produtores Agrícolas (IFAP), a Federação Mundial da Indústria de Saúde Animal (COMISA), a Federação dos Veterinários da Europa (FVE), o Colégio Americano de Medicina Veterinária Interna (ACVIM) e as Associações Americanas de

Médicos Veterinários (AVMA), bem como autoridades nacionais e internacionais (Guardabassi and Kruse, 2010).

No entanto, os piscicultores ainda contam com o uso agressivo de quimioterapêuticos para combater infecções bacterianas e infestações de ectoparasitas, bem como desinfectantes para gerenciar propagação de doenças (BurrIDGE *et al.*, 2010).

1.7. CONSEQUÊNCIA DA TRANSFERÊNCIA DE ANTIMICROBIANOS NO AMBIENTE

Informações sobre a ocorrência e as concentrações médias de resíduos dos principais antibióticos veterinários em diferentes matrizes ambientais encontram-se em anexo (tabela 9, capítulo V). De modo geral, as concentrações ambientais são relativamente baixas (ng/L ou Kg⁻¹ a µg/L ou Kg⁻¹), sendo consideradas insuficientes para ocasionar efeitos tóxicos agudos aos organismos expostos (Kümmerer, 2004; Regitano and Leal, 2010).

Os compostos são detectados a partir de diferentes classes de antibióticos importantes, tais como os macrólidos, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e β-lactâmicos. Obviamente, a maioria dos antibióticos não são totalmente eliminados durante o processo de purificação de águas residuais. Os resultados das investigações indicam que um certo número de antibióticos não é biodegradável no ambiente aquático, como a tetraciclina, que foi detectada no solo meses após a aplicação do adubo (Kümmerer, 2004).

Nas águas residuais, águas de superfície, sedimentos, lamas e solos, um cocktail de diferentes compostos activos podem estar presentes, em contraste com a aplicação médica e veterinária de antibióticos e desinfectantes. As concentrações são normalmente algumas ordens de grandeza mais baixa (Kümmerer, 2004). Contudo, pouco se sabe sobre o efeito crónico da exposição a baixas concentrações desses resíduos a longo prazo, qual o efeito em espécies que não são estudadas e qual o impacto ambiental vindo dos produtos de degradação desses antibióticos (Regitano and Leal, 2010).

No entanto, pode haver também efeitos indesejáveis sobre as populações selvagens, tais como interacções genéticas entre peixes de viveiro e peixes selvagens, transmissão de doenças pelos peixes que escaparam ou através da ingestão de resíduos contaminados (Read and Fernandes, 2003).

As bactérias dos animais normalmente sobrevivem por apenas pouco tempo no ambiente. No entanto, foi sugerido que as bactérias resistentes a antimicrobianos a partir de animais possam transferir os genes de resistência a bactérias do solo ambiente. Tem sido demonstrado que os genes de resistência antimicrobiana podem estar presentes nos

produtos residuais provenientes da produção animal e podem sobreviver durante um longo período de tempo no solo. (Aarestrup, 2006).

Por exemplo, em 2007, a FDA teve de bloquear temporariamente as vendas de cinco produtos da aquacultura da China, porque tinham salmonelas e, entre outros resíduos, nitrofuranos e fluoroquinolonas (Burridge *et al.*, 2010).

No entanto, em comparação com outras formas de transmissão, este método de propagação do ambiente é, provavelmente, de menor importância. No futuro, as mudanças no sistema de produção podem aumentar a importância da difusão do meio ambiente. Isto se a produção se tornar mais integrada ou mais intensiva em áreas geográficas de menores dimensões (Aarestrup, 2006).

1.8. OBJECTIVOS

Os agentes antimicrobianos utilizados em animais na Europa são muitas vezes idênticos, ou pertencem às mesmas classes, como os usados na medicina humana. A resistência antimicrobiana é o principal efeito colateral indesejável do uso de agentes antimicrobianos em seres humanos e animais, e os resultados são a selecção contínua de bactérias resistentes, patogénicas, bactérias comensais ou mesmo ambientais (EFSA and ECDC, 2013).

Assim, o principal objectivo deste projecto foi avaliar a susceptibilidade a agentes antimicrobianos em bactérias potencialmente patogénicas para o Homem, nomeadamente em *Aeromonas* sp. e *Enterobacteriaceae*, isoladas de robalo e na dourada, provenientes de sistemas de aquacultura comprados no comércio regional.

CAPÍTULO II

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os peixes usados neste estudo, nomeadamente robalos e douradas, foram cedidos pelos sistemas de aquacultura da Figueira da Foz e adquiridos no comércio regional, com origem em aquaculturas da região de Aveiro, Espanha e Grécia (tabela 4). Foi ainda recolhido sedimento da aquacultura da Figueira da Foz. As amostras foram retiradas do conteúdo intestinal e das brânquias, e foram semeadas em meios de cultura com e sem antibiótico.

Tabela 4: Origem das amostras.

Peixes	Origem	Quantidade
Robalo	Figueira da Foz	4
Robalo	Grécia	4
Dourada	Figueira da Foz	2
Dourada	Espanha	3
Dourada	Aveiro	1
Sedimentos	Figueira da Foz	1

2.2. MEIOS DE CULTURA SELECTIVOS

2.2.1. MEIO MC (*MACCONKEY*)

Agar MacConkey (Diagnostici Liofilchem, Liofilchem, Italy) é um meio de crescimento bacteriano selectivo para Enterobactérias. Inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas, devido à presença de violeta cristal e sais biliares. Pode diferenciar as bactérias que são capazes de fermentar a lactose, sendo as colónias de cor rosa (Online Education Resorces, 2013).

2.2.2. MEIO EMB (*EOSINE METHYLENE BLUE*)

O meio EMB (Diagnostici Liofilchem, Liofilchem, Italy) é um meio cromogéneo de diferenciação selectivo utilizado para o isolamento e diferenciação de bacilos entéricos gram-negativos (*Enterobacteriaceae* e outros bacilos gram-negativos) provenientes de amostras clínicas e não-clínicas (*BD EMB Agar, Eosin Methylene Blue Agar, Modified, 2011*).

Contém os corantes eosina e azul-de-metileno que inibem as bactérias gram-positivas num determinado grau. Os corantes funcionam também como indicadores de diferenciação em resposta à fermentação da lactose e/ou sacarose. Os coliformes produzem colónias

pretas-azuladas. As colónias de *Escherichia coli* poderão apresentar um reflexo verde metalizado característico, devido à rápida fermentação da lactose (BD EMB Agar, Eosin Methylene Blue Agar, Modified, 2011).

2.2.3. MEIO AMB (*AEROMONAS MEDIUM BASE*)

O meio AMB (Oxoid, England) foi desenvolvido para melhorar a detecção e isolamento de *Aeromonas* spp. a partir de amostras clínicas e ambientais. No entanto, para melhorar o seu desempenho no isolamento de *Aeromonas*, é recomendada a adição de ampicilina em 5 mg/L. As colónias apresentam cor verde-escura, com centros opacos escuros, com um tamanho de 0,5 - 1,5 mm de diâmetro. (Scientific, 2001).

2.3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS POR MÉTODOS FENOTÍPICOS

Todo o procedimento foi elaborado em condições de assepsia através de técnicas de microbiologia gerais.

As amostras dos peixes foram colocadas em 1mL de H₂O destilada Milli Q estéril. As amostras de sedimentos foram colocadas em 500 µL de H₂O destilada Milli Q estéril.

Numa fase inicial, a partir desta suspensão, foram inoculadas placas com tripticase de soja (TS) agar (Diagnostici Liofilchem, Liofilchem, Italy) e *MacConkey* (MC) agar (Diagnostici Liofilchem, Liofilchem, Italy) pelo método de esgotamento do inóculo para isolar as bactérias, e incubadas a 37°C (Binder, USA) durante 24h a 3 dias. Todos os dias as culturas foram observadas. O meio TS é um meio não selectivo, enriquecido, e o meio MC foi usado para isolar Enterobactérias, onde outros bacilos Gram-negativos, como *Pseudomonas* sp. também podem crescer.

Para eventual estudo posterior, 200 µL da suspensão inicial foram guardados num tubo com o meio Luria-Bertani (LB) (Diagnostici Liofilchem, Liofilchem, Italy) com 15% de glicerol (v/v), e congelados a -20°C.

Posteriormente foram também inoculadas placas de selecção para *Aeromonas* (AMB) e placas de selecção de EMB a partir da suspensão inicial (com vista a isolar *Escherichia coli*), de acordo com o procedimento mencionado em cima.

2.3.1. TESTE DA α -AMILASE:

Aeromonas sp. produzem a enzima amilase. De modo a diferenciar as bactérias que utilizam a enzima α -amilase para degradar o amido do meio de cultura na presença da solução de iodo foi adaptada a técnica de Palumbo e colaboradores (Palumbo *et al.*, 1985).

Foram inoculadas alíquotas de 50 μ L das suspensões iniciais em placas com meio *Brain Heart Agar* (BHA) (Diagnostici Liofilchem, Liofilchem, Italy) e TS com 0,1% de amido. Após a incubação a 28°C a 24, 48 e 72 horas, adicionaram-se 5 mL de iodo.

O iodo em contacto com o amido forma um complexo azul acastanhado. O amido hidrolisado não produz alteração de cor. Se aparecer uma zona clara após adição de iodo, é sinal de produção de α -amilase pela bactéria. Se não ocorrer uma zona clara, o amido não foi hidrolisado.

A formação de halos começa a ser visível aos 15 minutos. As bactérias com formação de halo foram isoladas em meio TS e incubadas 18-24h a 30°C (Consessus SA, Portugal).

2.3.2. TESTE OXIDASE

O teste de oxidase foi feito para determinar a presença ou ausência de actividade de oxidase no citocromo C. *Aeromonas* sp. e *Pseudomonas* sp. produzem esta enzima, enquanto que as Enterobactérias não (Rogol and Sechter, 1979). Portanto, todas as bactérias suspeitas de pertencerem a estes grupos, após crescimento nos meios anteriormente descritos, e positivas para o teste da amilase, foram testadas. O reagente da oxidase (BioMérieux) foi colocado num papel de filtro, e um pouco da cultura bacteriana com 18-24h de incubação foi colocada e esfregada no papel húmido com uma ansa de plástico, e observada a formação de cor. A prova positiva é dada em 1 minuto pela formação de uma cor púrpura.

2.3.3. IDENTIFICAÇÃO POR MICROMÉTODOS: API NE20

Em alguns isolados recorreu-se a micrométodos comerciais como o Api20 NE (BioMérieux) para identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores (*Aeromonas* sp.). O procedimento foi elaborado de acordo com as indicações do fabricante.

O procedimento consistia em distribuir cerca de 5 mL de água destilada estéril nos alvéolos para criar um ambiente húmido. Retirou-se a galeria da embalagem individual e colocaram-se na caixa de incubação. Preparou-se uma suspensão da cultura bacteriana de 18-24h com uma turbidez equivalente a exactamente 0,5 de McFarland (que corresponde a cerca de 150×10^6 células/mL). A inoculação da galeria foi feita enchendo os tubos de testes

D- glucose (GLU) a ácido fenil-acetato (PAC) com a suspensão anterior. Colocou-se a ponta da pipeta de lado, inclinando a caixa ligeiramente para a frente, para não formar bolhas no fundo dos poços. Abrindo uma ampola de API Médio AUX, adicionou-se 200 μL da suspensão restante para a ampola. Homogeneizou-se bem com a pipeta, evitando a formação de bolhas. Encheram-se os tubos e as cúpulas de GLU a PAC para os testes de assimilação com a suspensão. Adicionou-se óleo mineral para as cúpulas (GLU, ADH (L-arginina) e URE (ureia) até ser formado um menisco convexo. Fechou-se o quadro de incubação e incubou-se a 30°C durante 24 a 48h.

Após o período de incubação, anotaram-se todas as reacções espontâneas (GLU, ADH, URE, ESC (esculina), GEL (gelatina) e PNPG (4-nitrofenil- β D-galactopiranosido). A revelação dos testes da nitratase (NO_3) e do indol (TRP) foram protegidas da contaminação pelo ar. No teste NO_3 adicionou-se 1 gota de NIT I e 1 gota de NIT dois reagentes à cúpula NO_3 . A reacção utilizada para a identificação da bactéria é a redução de nitratos (presença de nitratase). No teste TRP adicionou-se uma gota de reagente JAMES.

Por fim, nos testes de assimilação, observou-se o crescimento bacteriano.

2.4. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

2.4.1 MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO

De modo a aferir a susceptibilidade das estirpes bacterianas em estudo a vários antibióticos, foi utilizado método de Kirby-Bauer ou método de difusão em disco. Os antibióticos testados foram: amoxicilina (10 μg); ácido nalidixico (30 μg); cloranfenicol (30 μg); tetraciclina (30 μg); trimetoprim (5 μg) e sulfametoxazol/ trimetoprim (5 μg) (Oxoid, United Kingdom).

Com a ança estéril, suspenderam-se algumas colónias isoladas de uma cultura de 18-24h em meio sólido (TS ou BHA) num tubo de H_2O estéril ajustando a turbidez a 0,5 da escala de MacFarland. De seguida, com uma zaragatoa estéril mergulhou-se na suspensão bacteriana, removendo o excesso, pressionando a zaragatoa contra o tubo, e semearam-se em toalha placas de agar Muller-Hinton (MH) (Diagnostici Liofilchem, Liofilchem, Italy) de modo homogéneo, passando a zaragatoa em, pelo menos quatro direcções diferentes. Aguardaram-se ± 5 minutos para o meio “absorver” a suspensão e colocaram-se os discos de antibióticos no agar com o dispensador de discos da Oxoid (Oxoid, United Kingdom). Incubou-se 18-24h a 37°C. Após incubação mediram-se e registaram-se os diâmetros dos halos de inibição de crescimento em milímetros, e interpretou-se segundo as normas do

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010). Para *Aeromonas* sp. foram utilizados os valores de referência da zona de inibição para bacilos Gram-negativos fermentadores como *Enterobacteriaceae* sp., uma vez que bacilos Gram-negativos como *Pseudomonas* sp. não apresentam valores de referência para todos os antibióticos testados. Foram comparadas as concentrações mínimas inibitórias do antibiótico (CMI) de alguns dos antibióticos das famílias acima mencionadas e viram-se que apresentavam valores idênticos. As bactérias foram classificadas como susceptível, intermédio e resistente de acordo com o CLSI das *Enterobacteriaceae*.

2.4.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA POR E-TESTE

O E-test quantifica directamente a susceptibilidade antimicrobiana, determinando a concentração mínima inibitória (CMI). Sendo processado como teste de difusão em disco, o E-teste difere pelo uso de tiras que contêm um gradiente de antibiótico, expresso em $\mu\text{g/mL}$. (Rosenblatt, 1996).

Antes de começar o procedimento, deve-se aguardar aproximadamente 30 minutos para que as tiras de antibiótico, guardadas a -20°C , atinjam a temperatura ambiente, para não haver perda de actividade do antibiótico. A metodologia foi idêntica à do método de Kirby Bauer descrita anteriormente (subcapítulo 2.4.1). Em vez dos discos, aplicou-se uma tira de E-teste (AB Biodisk, Sweden) por placa com a ajuda de uma pinça, tendo o cuidado a não formação de bolhas de ar. Teve-se em atenção para não tocar a parte da fita com o gradiente, somente a parte marcada com a letra E. Depois, aplicou-se no centro do meio de cultura. Por fim, foi a incubar 18-24h a 37°C . Após a incubação, mediu-se a CMI do antibiótico testado.

2.5. MÉTODOS MOLECULARES

2.5.1. EXTRACÇÃO DE ADN BACTERIANO

A) MÉTODO DA FERVURA (BOIL METHOD):

De forma a obter ADN bacteriano para reacções de PCR, procedeu-se à extracção das amostras, de acordo com o método de fervura.

Retiraram-se 4 ou 5 colónias da cultura bacteriana pura da placa com a ança, e diluíram-se em $500\ \mu\text{L}$ de H_2O estéril Eppendorf $1,5\ \text{mL}$ estéreis. Homogeneizou-se a mistura no vortex. Centrifugou-se a amostra durante 3 min a $10.000\ \text{rpm}$ (Thermo Scientific, USA) e descartou-se o sobrenadante, retirando o excesso com papel absorvente.

Adicionaram-se 100 µL de H₂O estéril e uniformizou-se novamente a suspensão no vortex. Furaram-se as tampas dos Eppendorf com o auxílio de uma ança esterilizada para estas não abrirem na fervura. Colocam-se os respectivos Eppendorf em banho-maria. Após 15 min, retirou-se o flutuador com as amostras com a ajuda de uma pinça.

Centrifugou-se a mistura durante 5 min a 10.000 rpm (Thermo Scientific, USA). Retirou-se o sobrenadante, e guardou-se a -20°C quando não utilizado de imediato.

B) QIAAMP DNA MINI AND BLOOD MINI KIT

Em amostras em que houve uma possível inibição da reacção de PCR, o ADN foi extraído das bactérias recorrendo a um método comercial. Neste caso utilizou-se o *kit QIAamp DNA mini and Blood Mini kit* da Qiagen (Izasa, Portugal) segundo as instruções do fabricante.

Retiraram-se bacterianas da placa de cultura e ressuspende-se em 180 µL de tampão de ATL num Eppendorf de 1,5 mL. Misturou-se por vortex até obter uma solução homogénea. Adicionaram-se 20 µL de proteinase K, misturou-se por vortex e incubou-se a 56°C com agitação moderada (Reagentes, Portugal), até o tecido se encontrar completamente lizado (lise 18-24h). De seguida, centrifugaram-se os Eppendorf de 1,5 mL para remover as gotas no interior da tampa e adicionam-se 200 µL Buffer AL. Misturou-se durante 15 segundos por vortex, e incubou-se a 70°C durante 10 min (Reagentes, Portugal). Centrifugou-se o Eppendorf para remover gotas de dentro da tampa. Foi formado um precipitado branco, que na maioria dos casos, que se dissolveu durante a incubação a 70°C. Adicionam-se 200 µL de etanol (98%), e misturou-se durante 15 segundos por vortex. Depois, centrifugou-se brevemente para remover gotas de dentro da tampa. Aplicou-se todo o precipitado, formado aquando da adição do etanol na coluna QIAamp MiniSpin. Aplicou-se a mistura para a coluna de centrifugação QIAamp MiniSpin (num tubo de recolha de 2 mL) e centrifugou-se a 6000 g durante 1 min. Colocou-se a coluna de centrifugação QIAamp MiniSpin num tubo de recolha limpo, e descartou-se o filtrado. Como a solução não passou completamente através da membrana, centrifugou-se novamente à velocidade máxima (20.000 rpm).

Abriu-se cuidadosamente a coluna QIAamp MiniSpin e adicionam-se 500 µL de tampão AW1. Centrifugou-se a 6000 g durante 1 min. E descartou-se o tubo com o filtrado colocando a coluna QIAamp MiniSpin num tubo de 2 ml limpo. Posteriormente, adicionam-se 500 µL de tampão AW2 e centrifugou-se à velocidade máxima durante 3 min. Descartou-se o tubo colector com o sobrenadante. Colocou-se a coluna de QIAamp MiniSpin num

novo tubo e centrifugou-se à velocidade máxima durante 1 min. Este passo ajudou a eliminar o restante tampão AW2.

Por fim, colocou-se a coluna QIAamp MiniSpin num tubo Eppendorf de 1,5 mL, e descartou-se o tubo colector. Abre-se cuidadosamente a coluna de centrifugação QIAamp MiniSpin e adicionaram-se 200 µL de Buffer AL, colocou-se à temperatura ambiente durante 1 min e, em seguida, centrifugou-se a 6000 g durante 1 min. Repetiu-se este passo 2 vezes. O ADN bacteriano purificado foi guardado a -20°C até posterior utilização.

2.5.2. AMPLIFICAÇÃO POR REACÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

O PCR (*Polymerase Chain Reaction*) possibilita a amplificação de sequências específicas numa mistura complexa de ADN. A partir de uma única cópia de ADN contida na amostra, é possível produzir rapidamente cerca de um bilhão de réplicas de produtos de PCR. A especificidade da reacção é determinada pela especificidade dos *primers* (Powledge, 2004).

PCR foi usada na identificação das bactérias e na detecção de genes de β-lactamases.

2.5.3. IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS POR MÉTODOS MOLECULARES: 16S rDNA

Após a identificação por métodos fenotípicos e avaliação da susceptibilidade aos antibióticos, todos isolados classificados como “intermédio” e “resistente” foram identificados por amplificação do 16S rDNA.

Na tabela 5 aparecem esquematizados os componentes da PCR seguido das respectivas quantidades utilizadas e do conjunto de *primers* testados.

Inicialmente começou por se testar o conjunto de *primers* descritos por Bosshard e Zbinden (2006). Testou-se também o conjunto descrito por Magray e colaboradores (2011) e o conjunto descrito por Borrel e Acinas (1997), como evidencia a tabela abaixo.

Começou por se adicionar os volumes da solução pela ordem decrescente de valor para um tubo de PCR de 0,2 mL. A fim de se comparar a banda obtida foi usado um controlo positivo (*Escherichia coli* 77), e um controlo negativo (H₂O) para ver a funcionalidade do PCR.

As amostras foram colocadas no termociclador (Biometra, USA) para se proceder à reacção em cadeia de polimerase.

O programa de amplificação de ADN consistiu num ciclo de desnaturação inicial (95°C, 5 min), seguido de 29 ciclos com desnaturação (95°C, 1 min), hibridação (56°C, 1 min) e extensão (72°C, 1 min), e por fim, a extensão final (72 °C, 10 min)

Tabela 5: Constituintes da reacção PCR 16s rDNA com os respectivos tamanhos esperados dos fragmentos.

Solução para PCR	Primers [10pmol/ μ L]	Primers Forward e Reverse	Tamanho esperado do amplificação	Ref.
Master Mix (DyDNAzyme TM II, FINNZYMES, Finland) - 10 μ L; Primer (F) - 0,5 μ L; Primer (R) - 0,5 μ L; H ₂ O - 8 μ L; ADN - 1 μ L.	F - Bak I IHW R - Bak2	F [AGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG] R [GGACTAC(C/T/A)AGGGTATCTAAT]	796 pb (pares de base)	(Bosshard and Zbinden, 2006)
	F - Bak I IHW R - E.coli	F [AGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG] R [CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC]	1,183 pb	(Magray et al., 2011)
	F - Bak I IHW R - Aer.	F [AGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG] R [GGTTACCTTGTTACGACTT]	1,483 pb	(Borrell and Acinas, 1997)

2.5.3.1. VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS EM GEL DE AGAROSE

O gel de agarose possibilita a separação de moléculas ionizadas, de acordo com a carga eléctrica e o peso molecular. Fragmentos com carga negativa migram para o pólo positivo e moléculas com carga positiva migram para o pólo negativo. Para tal, é estabelecida a diferença de potencial entre dois eléctrodos ligados aos terminais de uma fonte de corrente contínua. A corrente eléctrica, ao passar pelo meio tamponado, conduzida pelos pequenos iões presentes na solução, faz os fragmentos correrem pelo gel (Oliveira et al., 2007).

Para se visualizar os amplicões obtidos na reacção de PCR, fez-se um gel de 1% de agarose (Conda, Pronadisa) com TBE 0,5x (50 mL TBE 10x (0,89M Tris; 0,89M ácido bórico; 20mM EDTA, pH=8,2, 1000mL) com 950 mL H₂O), num volume de 30 mL, ao qual se adicionaram 3 μ L de brometo de etídio para visualização directa do ADN no gel. O corante intercala-se nas bases emparelhadas dos ácidos nucleicos e emite fluorescência vermelho-alaranjada (560 nm) quando iluminado com luz ultravioleta (260 a 360 nm) (Oliveira et al., 2007).

Após solubilização da agarose no tampão por aquecimento em microondas, verteu-se o gel para o berço e colocaram-se os respectivos pentes. Deixou-se polimerizar (cerca de 20 min). Retirou-se com cuidado o pente, e colocou-se o berço com o gel na tina que tinha TBE. Antes da aplicação, as amostras foram misturadas com tampão de carga, azul de bromofenol.

Adicionou-se 3 μ L de marcador de peso molecular (1.000 pb) e (10.000 kb) para saber o tamanho estimado da banda da amostra comparando com o marcador com pesos conhecidos, a 3 μ L de azul bromofenol para este dar peso suficiente à amostra. Colocou-se a mistura no poço do pente. Seguido de 6 μ L do controlo positivo com 3 μ L de azul bromofenol. Após a aplicação do controlo negativo e das amostras, colocou-se o gel a correr, durante 1 hora a 80 V. Por fim, coloca-se o gel no transiluminador e liga-se a 100% UV.

2.5.3.2. SEQUENCIAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Os produtos amplificados foram purificados adicionando 4 μ L da enzima ExoSAP a cada amostra e colocados no termociclador num programa a 37°C durante 15 min seguido de 15 min a 80°C, e foram sequenciados nos dois sentidos da cadeia de ADN pela StabVida (Portugal). Os resultados foram analisados recorrendo ao software disponível na internet BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) visível na fig. 2 (capítulo VII) e editados através do programa BioEdit.

2.5.4. DETECÇÃO DE B-LACTAMASES DO TIPO TEM E SHV

As beta-lactamases do tipo TEM e SHV foram pesquisadas por PCR multiplex nos isolados resistentes à amoxicilina.

Na tabela 6 aparecem esquematizados os componentes da reacção PCR seguida das respectivas quantidades utilizadas. O procedimento foi idêntico ao 2.5.2.I com excepção dos *primers*, que são específicos para genes SHV e TEM.

O programa de amplificação de ADN consistiu num ciclo de desnaturação inicial (95°C, 5 min), seguido 29 ciclos com desnaturação (95°C, 1 min), hibridação (61°C, 1 min) e extensão (72°C, 1 min), e por fim, a extensão final (72°C, 10 min).

Tabela 6: Constituintes da reacção de PCR para detecção de genes TEM e SHV com os respectivos tamanhos esperados dos fragmentos

Solução para PCR	Primers	Primers Forward e Reverse	Tamanho esperado do amplicão	Ref.
Master Mix (DyDNAzyme TM II, FINNZYMES, Finland) - 10 µL; Primer (F) - 0,5 µL; Primer (R) - 0,5 µL; Primer (F) - 0,5 µL; Primer (R) - 0,5 µL; H ₂ O - 8 µL; ADN - 1 µL.	SHV [30pmol/ µL]	F – [TCAGCGAAAAACACCTTG] R – [TCCCGCAGATAAATCACCA]	471 pb	(Mendonça <i>et al.</i> , 2007)
	TEM [10pmol/ µL]	F – [TACGATACGGGAGGGCTTAC] R – [TTCCTGTTTTTGCTCACCCA]	716 pb	

2.5.5. VISUALIZAÇÃO EM GEL DE AGAROSE

Para a visualização do produto PCR, procede-se da forma descrita no passo 2.5.3.1, com excepção da concentração do gel. Neste caso, foi feito um gel de 2% de agarose.

A concentração da agarose influencia a migração do gel, pois separa com mais eficácia bandas com tamanhos muito próximos.

2.6. EXTRACÇÃO DE ADN PLASMÍDICO

A extracção de plasmídeos foi feita em *Aeromonas* sp., numero 8, subcapítulo 3.5.3, com resistência 'intermédia' ao trimetoprim e resistência à amoxicilina. Foram usadas várias técnicas de extracção de plasmídeos, uma vez que nem sempre foi possível observar bandas.

2.6.1. PELO KIT PLASMID MINIPREP (JETQUICK)

Para extracção dos plasmídeos, usou-se o kit *Plasmid Miniprep da Jetquick* (Jetquick, Genomed GmbH, Germany). Todo o procedimento foi elaborado de acordo com as indicações do fabricante.

A bactéria *Aeromonas* foi primeiramente inoculada em caldo TS líquido e incubada 18-24h a 37°C.

Começou por se colocar 1 mL do caldo num Eppendorf de 1,5 mL e centrifugou-se a amostra. Descarta-se o sobrenadante e todos os vestígios com auxílio de papel absorvente. Adicionaram-se 250 µL de solução de G1 (50 mM Tris/HCl (pH 8); 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNase) ao sedimento e ressuspendeu-se, até que a suspensão se tornar homogénea.

Para se proceder à lise celular, adicionaram-se 250 μL de solução de G2 (200 mM NaOH; 1% SDS [w/v]) e misturou-se delicadamente, invertendo o tubo várias vezes. Incubou-se à temperatura ambiente durante 5min. Ao fim dos 5 min adicionou-se 350 μL de solução de G3 (acetato e hidrocloreto de guanidina) e misturou-se delicadamente por inversão, até se obter uma suspensão homogénea. Centrifugou-se a mistura 14.000 rpm durante 10 min. Colocou-se uma coluna JetQuick num tubo de 2 ml e colocou-se o sobrenadante.

O passo que se segue foi feito, no entanto é opcional, adicionaram-se 500 μL da solução GX (etanol acetato, hidrocloreto de guanidina, EDTA) na coluna de centrifugação, deixou-se repousar durante 1 min, e centrifugar a 12.000 x g durante 1 min. Descartou-se o sobrenadante e colocou-se a coluna Jetquick de volta para o mesmo tubo receptor.

Adicionaram-se 500 μL de solução G4 (etanol, NaCl, EDTA e Tris/HCl) e centrifugou-se a 12.000 x g por 1 min. Descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente à velocidade de 14.000 rpm durante 1 min para eliminar os resíduos da solução G4.

Por fim, para eluir os plasmídeos, colocou-se a coluna de centrifugação Jetquick para um novo tubo de microcentrifugação de 1,5 mL e adicionaram-se 50 μL de H₂O destilada estéril directamente para o centro da matriz de sílica da coluna. Centrifugou-se a 12.000 x g durante 2 minutos. Guardou-se a amostra obtida a -20°C.

2.6.2. PLASMID OR COSMID DNA PURIFICATION - QIAGEN PLASMID MIDI AND MAXI KITS

Usou-se também o *kit Plasmid or Cosmid DNA purification da Qiagen (Qiagen, UK)*. Todo o procedimento foi elaborado de acordo com as indicações do fabricante. Foi feito o protocolo com os volumes menores e também com os volumes maiores (em itálico).

A bactéria *Aeromonas* foi primeiramente inoculada em caldo LB líquido com um disco de trimetoprim e incubada a 37°C durante 8h com agitação.

Começou por se diluir a cultura de 1/500 a 1/1000 em meio LB selectivo. Inoculou-se 25 mL (*100 mL*) de meio com 25-50 μL (*100-200 μL*) da cultura inicial. Para plasmídeos de baixa cópia, inocularam-se 100 mL ou (*500 mL*) do meio com 100-200 μL (*250-500 μL*) de cultura inicial. Incubou-se a 37°C durante 12-16 h, com agitação. Centrifugou-se a 6.000 g durante 15 min a 4°C e eliminou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se completamente o sedimento com 4 mL (*10 mL*) de tampão de P₁ (50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rnase A). E adicionaram-se 4 mL (*10 mL*) de tampão P₂ (200mM NaOH, 1% SDS

(w/v)), misturou-se bem por inversão 4-6 vezes, e incubou-se à temperatura ambiente durante 5 min. Não se deixou a reacção de lise durante mais de 5 min.

Adicionaram-se 4 mL (10 mL) de tampão P₃ (3,0 M acetato de potássio, pH 5,5), misturou-se imediatamente e vigorosamente por inversão 4-6 vezes, e incubou-se no gelo por 15 min (20 min). Após adição de tampão P₃, a mistura tornou-se menos viscosa. Centrifugou-se a 20.000 g durante 30 min a 4°C. Removeu-se o sobrenadante contendo ADN de plasmídeo. Centrifugou-se o sobrenadante novamente a 20.000 g durante 15 min a 4°C. Esta segunda etapa de centrifugação foi realizada para evitar a aplicação de material de partículas em suspensão.

Por opção, removeu-se 240 µL (120 µL) da amostra a partir do sobrenadante e guardou-se para determinar se as condições de crescimento e lise foram óptimas.

De seguida colocou-se a coluna QIAGEN-tip 100 (QIAGEN-tip 500), aplicando 4 mL (10 mL) de tampão QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% isopropanol (v/v); 0,15% Triton® X-100 (v/v)). Aplicou-se o sobrenadante na coluna permitindo a passagem para o fluxo de resina por gravidade.

Removeu-se, por opção, 240 µL (120 µL) da amostra a partir do fluxo e para determinar a eficiência de ligação ao ADN à resina Qiagen.

Lavou-se a coluna com 2x10 mL (2x30 mL) de tampão QC (1,0 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% isopropanol (v/v)). A primeira lavagem foi suficiente para remover os contaminantes de ADN plasmídico.

De seguida, removeram-se 400 µL (240 µL) da amostra a partir das fracções de lavagem combinadas (amostra 3). Eluiu-se o ADN com 5 mL (15 mL) de Tampão QF (1,25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8,5; 15% isopropanol). E por fim, retiraram-se 100 µL (60 µL) da amostra (amostra 4). Precipitou-se o ADN pela adição de 3,5 mL (10,5 mL). Misturou-se bem e centrifugou-se imediatamente a 15.000 g durante 30 min a 4°C. Decantou-se cuidadosamente o sobrenadante. Lavou-se o ADN com 2 mL (5 mL) de etanol 70% e centrifugou-se a 15.000 g durante 10 min. Cuidadosamente decantou-se novamente o sobrenadante.

Por fim, secou-se o sedimento durante 5-10 min na estufa a 37°C, e redissolveu-se o ADN em 30 µL de H₂O destilada estéril. Guardou-se a amostra a -20°C.

2.6.3. MÉTODO BIRNOBOIM E DOLY ADAPTADO

A extracção foi efectuada a partir de uma cultura em placa e através de uma cultura em meio LB com um disco de trimetoprim, suspendendo num Eppendorf de 1,5 mL

diversas colónias em água destilada estéril, de modo a obter uma suspensão densa. A partir de um tubo de cultura fresca, transferiu-se 1,5 mL da suspensão bacteriana. Centrifugou-se (Sigma, Portugal) a 18.000 g durante 3 min, eliminando o sobrenadante. Adicionaram-se 100 µL da solução 1 (1 mL de glucose 500 mM, 1 mL de EDTA 100mM, 2,5 mL Tris HCL 100 mM a pH 8, 40 mg de lisozima, perfazendo o volume de 10 mL com H₂O estéril) que se encontrava a 4°C, ressuspendendo com a pipeta e deixou-se durante 10 min à temperatura ambiente, tornando-se a suspensão viscosa. Colocaram-se os tubos no gelo e adicionaram-se 200 µL da solução 2 (0,6mL de NaOH 2N, 0,6mL SDS 10% e 4,8 mL de H₂O destilada) agitando por inversão 1 a 2 vezes, deixaram-se os tubos no gelo durante 5 min.

Se seguida, adicionaram-se 150 µL da solução 3 (6 mL Acetato de Potássio 5M pH 4,8, 1,5mL de ácido acético glacial e 2,5 mL de H₂O destilada) que se encontrava a 4°C, agitando por inversão suavemente e colocaram-se no gelo. Após 45 min, centrifugou-se a amostra durante 3 min a 18.000 g. Entretanto, num outro Eppendorf identificado, adicionaram-se a mistura de 400 µL de fenol saturado e clorofórmio. Após centrifugação, pipetaram-se 400 µl do sobrenadante para estes novos tubos, agitando por suave inversão 30 vezes, centrifugando-se de seguida, 5 min a 18.000 g.

Colocaram-se 900 µL de etanol absoluto guardado a -20°C, em novos tubos identificados, aos quais se adicionaram 350 a 400 µL de sobrenadante resultante da extracção fenol clorofórmio. Agitaram-se os tubos por suave inversão, e colocaram-se a -20°C durante 90 min. Centrifugou-se a amostra durante 30 min a 18.000 g. Eliminou-se o sobrenadante, tendo em atenção o possível desprendimento do sedimento. Adicionaram-se 400 µL de etanol a 70% igualmente a -20°C, invertendo 2 a 3 vezes para lavar o sedimento. Centrifugou-se durante 12 min a 18.000 g, eliminando o sobrenadante com cuidado, repete-se este passo 2 vezes.

Por fim, colocou-se o Eppendorf na estufa a 37°C para secar bem o sedimento, e ressuspendeu-se em 10 µL de H₂O destilada estéril, aos quais se adicionaram 4 µL de RNase a 1mg/mL, deixando-se 15 min a temperatura ambiente. E guardou-se a amostra a -20°C.

2.7. CONJUGAÇÃO

Com a ança estéril colocou-se uma colónia isolada da bactéria dadora *Aeromonas* numero 8 (resistente trimetoprim e amoxicilina) em caldo LB com agitador (Model G25 incubator Shaker, USA), com e sem disco de antibiótico, e colocou-se a crescer na estufa a 37°C durante 4-6h. Fez-se o mesmo procedimento com a bactéria receptora *Escherichia coli*

J53 (resistente à azida de sódio), sem antibiótico. Ao fim das 6 horas viu-se a turvação do meio, sinal de crescimento bacteriano. De seguida, transferiu-se para novo caldo TSB (tripticase soja broth) 500 µL da bactéria receptora e 50 µL da bactéria dadora. E incubou-se 18-24h a 37°C.

Por fim, fez-se meio selectivo com suplemento de antibiótico de ampicilina (2,5 mg/mL), azida de sódio (5 mg/mL) e trimetoprim (4 mg/mL) e fez-se espalhamento em estria, para ver se houve formação de transconjugantes.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

3.1.1. MÉTODOS FENOTÍPICOS

Inicialmente, o conteúdo intestinal dos peixes, a solução de lavagem das brânquias e o sedimento foram cultivados em meio tripticase soja (TS) e MacConkey (MAC) para observar a relativa abundância e variabilidade de colónias. Com o meio de MAC pretendiam-se observar colónias fenotipicamente sugestivas de *E. coli*, que aparecem neste meio de cor rosa forte, e não mucosas. E confirmando os resultados posteriormente em meio EMB, em que a *E. coli* aparece verde metalizado característico. Na gelose TS tentou-se seleccionar o género *Aeromonas* por métodos fenotípicos através do teste da α -amilase segundo Palumbo e colaboradores (1985) (Palumbo *et al.*, 1985). Observou-se também uma enorme variedade de colónias, de várias cores, formas e tamanhos, o que era esperado, visto não ser um meio selectivo. No meio MAC não se observaram colónias sugestivas de *E. coli*, mas foram observadas outras, rosas e mucosas, e colónias não rosa, ou seja, não fermentadoras de lactose.

As amostras foram então semeadas nos meios selectivos MAC (para Enterobactérias) e meio AMB (para *Aeromonas* sp.). Após a incubação, e da observação cuidadosa das colónias, as que apresentavam características sugestivas de Enterobactérias fermentadoras da lactose (cor rosa) e *Aeromonas* sp. foram retiradas e cultivadas para posterior estudo. Foram ainda guardadas algumas colónias não fermentadoras da lactose. Adicionalmente, as amostras foram semeadas em meio selectivo adicionado de ampicilina, o que é indicado para o meio de AMB no isolamento de *Aeromonas* sp., mas também foi adicionado ao meio MAC. Na gelose AMB, após incubação, foram observadas pelo menos três tipos de colónias diferentes, umas verdes com centro negro, outras verde-escuras e umas pequenas verdes amareladas.

Aeromonas sp. e Enterobactérias podem diferenciar-se pelo teste da oxidase, e este foi realizado em colónias sugestivas destes microrganismos, e também nas bactérias não fermentadoras da lactose isoladas.

Uma vez que era completamente desconhecido o nível de resistência aos antibióticos das bactérias isoladas do robalo e dourada de aquacultura, foram feitos inicialmente testes de susceptibilidade aos antibióticos em 151 isolados retirados dos diversos meios de cultura anteriormente usados (ver subcapítulo 2.2), ou seja, com base na identificação presuntiva

fenotípica. Observou-se que a grande a maioria dos isolados eram susceptíveis aos antibióticos testados (108 amostras).

Foram seleccionados 43 isolados que apresentavam diminuída susceptibilidade ou resistência, segundo as normas do CLSI (CLSI, 2010), a pelo menos um antibiótico testado (dados apresentados no subcapítulo 3.3) para identificação por métodos moleculares.

Os resultados dos testes fenotípicos (crescimento em meio selectivo MAC e AMB, com ou sem amoxicilina; teste da amilase; teste da oxidase) encontram-se na tabela 7, já com a indicação do género determinado por amplificação da região do 16S rDNA (subcapítulo 3.2.).

3.1.2. MÉTODOS MOLECULARES

Inicialmente começou por se testar o conjunto de *primers* de Bosshard e colaboradores (2006) descritos para *Escherichia coli*. Contudo, apenas quatro enterobactérias foram identificadas pelo conjunto, nomeadamente duas *Pantoea* sp., uma *Buttiauxella* sp. e uma *Erwinia* sp., apresentadas na tabela 7.

Posteriormente testou-se o conjunto de *primers* de Borrell e colaboradores (1997), descrito para *Aeromonas* sp., no entanto, não se obtiveram resultados positivos para a bactéria pretendida, apenas para *Buttiauxella* sp. e *Erwinia* sp., pelo que se deixou de utilizar este conjunto, optando por utilizar o conjunto de *primers* universais de Magray e colaboradores (2011), descritos para *Escherichia coli*.

Todos os amplicões obtidos por PCR pelo conjunto de *primers* universais de Magray e colaboradores (2011), como se pode visualizar num exemplo, fig. 2, em que os amplicões apresentam cerca de 1.000 pb de tamanho.

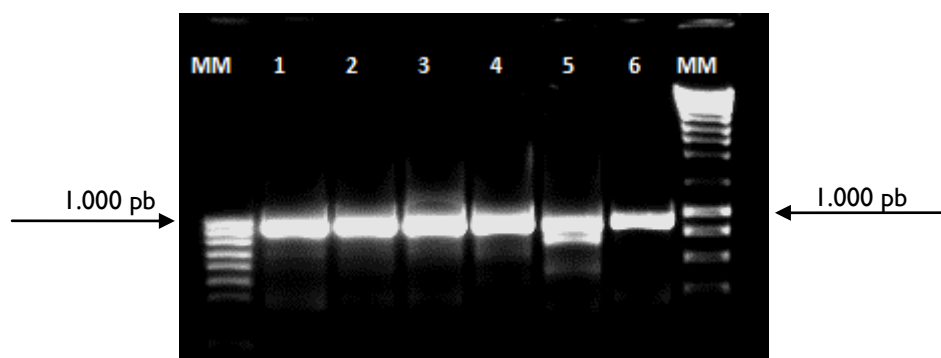


Fig. 2: Gel de prova do produto amplificado 16s rDNA.

MM – Marcador molecular de ADN de 1000pb e 10.000pb; 1- *E.coli* 77, controlo positivo; 2 - *Aeromonas* sp., nº14; 3 - *Aeromonas* sp., nº19; 4 – *Buttiauxella* sp., nº15; 5 - *Buttiauxella* sp., nº6; 6 - *Pantoea* sp., nº2.

Os produtos amplificados pelo programa 16s ADN foram sequenciados nos dois sentidos da cadeia de ADN. Os resultados foram editados através do programa BioEdit, como podemos ver esquematizado na figura 3. A edição da sequência é feita apenas para eliminar nucleótidos não específicos (N), ou para colocar o nucleótido correcto na sequência de acordo com o respectivo gráfico.

Em cima, podemos ver o emparelhamento das duas cadeias. Em baixo vemos os gráficos de cada sequência (5' – 3'). No caso de a sequenciação ter sido feita nos dois sentidos, é importante reverter a sequência (3' – 5') para um emparelhamento correcto.

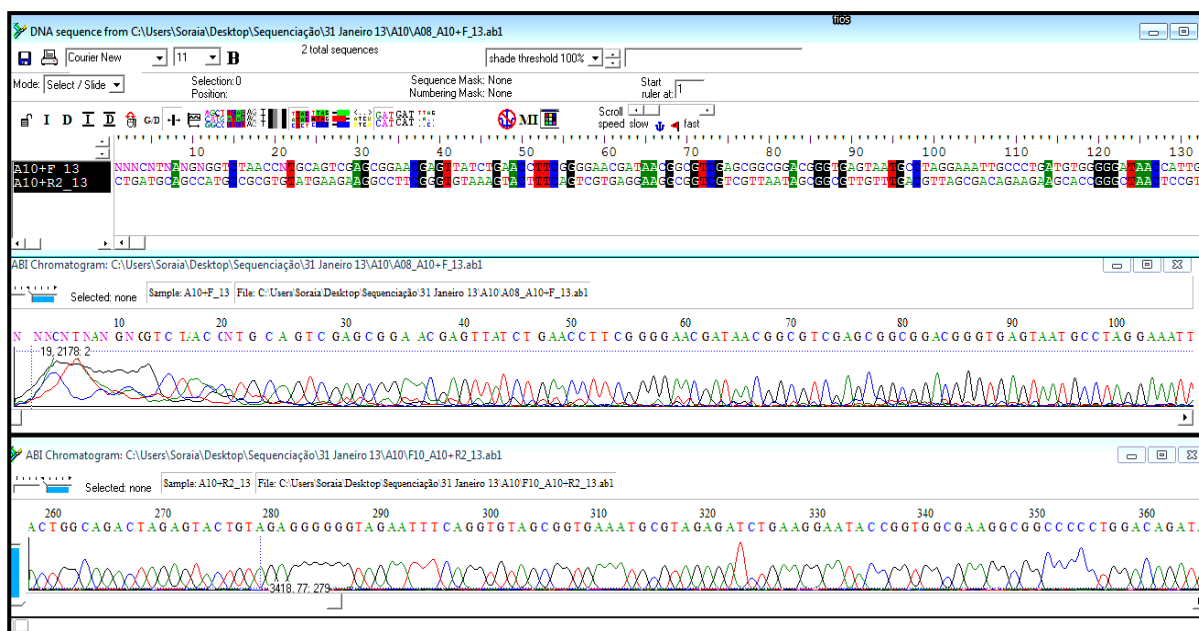


Fig. 3: Imagem ilustrativa do programa utilizado para a editar a sequência das bactérias.

Foi necessário fazer uma sequência consenso e esta foi colocada no *software* disponível na internet BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) dando o género da bactéria.

Está visível na fig. 4 a sequência da *Aeromonas* sp., nº8 da tabela 7, utilizada para os diversos testes. A análise pelo BLAST demonstrou um índice de diversidade entre as bactérias, como podemos ver na tabela 7. Os resultados entre as sequências obtidas em relação às do banco de dados apresentaram entre 90-99% de similaridade, o que indica confiabilidade para os resultados encontrados.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1574 bits(852)	0.0	863/868(99%)	4/868(0%)	Plus/Minus
Query 1	CAGGCGGTGCGATTTTAAACGCGTTTAGCTTTCGGGAGCCACGCTCTCAAGGACACAGCCTCC			60
Sbjct 874	CAGGCGGTGCGA-TTTAAACGCG-TTAGC-TCCGGGAGCCACGCTCTCAAGGACACAGCCTCC			818
Query 61	AAATCGACATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAAGGATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGC			120
Sbjct 817	AAATCGACATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAAGGATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGC			758
Query 121	TTTCGCACTGAGCGTCACTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCTCTCCA			180
Sbjct 757	TTTCGCACTGAGCGTCACTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCTCTCCA			698
Query 181	GATCTCTAGCATTTCACCGCTACACCTGGAAITCTACCCCOCTCTACAAGACTCTAGCT			240
Sbjct 697	GATCTCTAGCATTTCACCGCTACACCTGGAAITCTACCCCOCTCTACAAGACTCTAGCT			638
Query 241	GGACAGTTTTAAATGCAATTCOCAGGTTGAGCCCGGGCTTTCACATCTAACTTATCCAA			300
Sbjct 637	GGACAGTTTTAAATGCAATTCOCAGGTTGAGCCCGGGCTTTCACATCTAACTTATCCAA			578
Query 301	CCGCTCGGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCGGATTAACGCTTGCACCOCTCCGTATTACC			360
Sbjct 577	CCGCTCGGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCGGATTAACGCTTGCACCOCTCCGTATTACC			518
Query 361	GCGGCTGCTGGCAGGAGTTAGCCGCTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCACAGTTGACACG			420
Sbjct 517	GCGGCTGCTGGCAGGAGTTAGCCGCTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCACAGTTGACACG			458
Query 421	TATTAGGCGCCAACTTTCTCTCTGCTGAAAGTGCITTTACAACCCGAAAGGCTTCTTCA			480
Sbjct 457	TATTAGGCGCCAACTTTCTCTCTGCTGAAAGTGCITTTACAACCCGAAAGGCTTCTTCA			398
Query 481	CACACGCGCATGGCTGCATCAGGGTTTCCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCT			540
Sbjct 397	CACACGCGCATGGCTGCATCAGGGTTTCCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCT			338
Query 541	CCCCTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGC			600
Sbjct 337	CCCCTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGC			278
Query 601	TAGGGATCGTCCCTTGGTGGACCATTAACCCACCACTAGCTAATCCACCTGGGTTCA			660
Sbjct 277	TAGGGATCGTCCCTTGGTGGACCATTAACCCACCACTAGCTAATCCACCTGGGTTCA			218
Query 661	TCCAAATCGCGAAAGGCCGAAAGTCCCTCCTTTCCCCCGTAGGGCGTATGCGGTATTAG			720
Sbjct 217	TCCAAATCGCGAAAGGCCGAAAGTCCCTCCTTTCCCCCGTAGGGCGTATGCGGTATTAG			158
Query 721	CAGTCGTTTCCAACTGTTATCCOCTCGACTGGGCAGATCCCCAGGCATTACTCACCCGT			780
Sbjct 157	CAGTCGTTTCCAACTGTTATCCOCTCGACTGGGCAGATCCCCAGGCATTACTCACCCGT			98
Query 781	CCGCCGCTCGCCGGCAAAAGTAGCAAGCTACTTTCCCGCTGCCGCTCGACTTGCATGTGT			840
Sbjct 97	CCGCCGCTCGCCGGCAAAAGTAGCAAGCTACTTTCCCGCTGCCGCTCGACTTGCATGTGT			38
Query 841	TAGGCTGCCC-GCCAGCGTTCAATCTGA 868			
Sbjct 37	TAGGCTGCC-GCCAGCGTTCAATCTGA 11			

Fig. 4: Sequência de *Aeromonas* sp., nº8 da tabela 7, proveniente do software BLAST. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

Como podemos ver na tabela 7 foram identificadas, por amplificação da região 16S rDNA e sequenciação dos produtos amplificados, 13 *Aeromonas* sp., 8 enterobactérias, nomeadamente 3 *Pantoea* sp., 2 *Buttiauxella* sp., 2 *Klebsiella* sp. e 1 *Erwinia* sp., 10 *Stenotrophomonas* sp., 7 *Pseudomonas* sp., 2 *Acetobacter* sp., 2 *Achromobacter* sp. e uma *Vibrio* sp., ou seja, um total de 43 bactérias resistentes a pelo menos um antibiótico.

É de notar que não houve *Escherichia coli* isolada nos resultados obtidos. No entanto, foram encontradas outras enterobactérias, descritas como pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (Chatterjee and Starr, 1972; Gavini et al., 1989; Müller et al., 1996).

Grigorakis e Rigos (2011) sugerem que a enorme variedade de bactérias encontradas provêm da vasta gama de espécies cultivadas, da diversidade dos sistemas e do ambiente (Grigorakis and Rigos, 2011). Bactérias como *Aeromonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Acetobacter* sp., *Vibrio* sp. e *Achromobacter* sp., já foram encontradas em

amostras de peixes, águas (tratadas ou não) e ambiente, pelo que é normal a sua presença nos peixes testados (Adams, Farber and Lerke, 1964; Press and Lillehaug, 1995; Trcek and Teuber, 2002; Miranda and Kehrenberg, 2003).

Bactérias como *Aeromonas*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Vibrio*, *Enterobacteriaceae* e *Achromobacter* encontram-se no tracto digestivo dos peixes, embora a colonização bacteriana seja dominada por *Aeromonas* e *Vibrio*. No entanto, a bactéria *Achromobacter* encontra-se mais nas brânquias dos peixes (Austin, 2006).

Alguns destes géneros são patogéneos oportunistas para o Homem, destacando-se algumas espécies de *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp. e de enterobactérias. Outras, como *Aeromonas* sp., não estão frequentemente associadas a infecção em humanos, mas esporadicamente aparecem alguns casos. Embora *Aeromonas* sp. seja um género encontrado em ambiente aquático e associado a infecções nos peixes, já foi encontrado como causa de infecções humanas como um patogéneo oportunista. (Daily and Joseph, 1981). Também a enterobactéria *Erwinia* sp. é patogénica no Homem (Chatterjee and Starr, 1972), assim como, *Achromobacter insolitus* sp. e *Achromobacter spanius* sp. já foram detectadas em amostras clínicas humanas (Coenye, 2003). O género *Acetobacter* pode também provocar infecções humanas (Gouby et al., 2007).

Em 2002, *Buttiauxella gaviniae* foi isolada da medula espinal de um paciente com patologia na bexiga (Baere et al., 2002). Bactérias como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella* sp. e *Pantoea* sp. foram identificadas como espécies mais susceptíveis de contaminar a nutrição parenteral. É de salientar a importância do risco desta contaminação para os recém-nascidos em unidades de terapia intensiva neonatal (Habsah et al., 2005). Ainda Kim e colaboradores (2013) identificaram genes de resistência a quinolonas em plasmídeos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes pediátricos com infecções na corrente sanguínea (Kim et al., 2013).

Vibrio cholerae, agente etiológico da cólera, está presente na água para consumo em número suficiente para constituir uma dose infecciosa, quando ingerido (Lobitz et al., 2000).

Pseudomonas aeruginosa, é considerada uma das três principais causas de infecções oportunistas em humanos segundo Stover e colaboradores (2000). Um factor importante é sua resistência intrínseca a antibióticos (Stover et al., 2000).

Assim, os peixes possuem um diversificado tipo de bactérias, muitas vezes reflectindo a composição da microflora da água circundante. A exposição de peixes a agentes antimicrobianos tem, sem dúvida, um impacto sobre a composição da sua microflora e sobre os padrões de resistência a antibióticos. Isto, por sua vez, pode ter impacto sobre a

transmissão de resistência a antibióticos para outras bactérias, bactérias essas que podem integrar a cadeia alimentar e/ou causar infecções oportunistas no Homem e outros animais, assim como, aumentar a probabilidade de disseminação de elementos genéticos móveis onde se inserem genes de resistência aos antibióticos (Austin, 2006).

A tabela 7 apresenta os isolados resistentes a pelo menos um antibiótico testado com a respectiva identificação pela amplificação da região 16S rDNA relacionando com a origem do isolado, meio de cultura de isolamento, teste da amilase e oxidase e primers testados para a identificação. É de salientar que houve adição de suplemento de ampicilina (5 mg/L) ao meio AMB (*Aeromonas* Medium Base) e ao meio MAC (MacConkey agar), que apresenta a designação de '+A' na tabela.

Como se observa, apenas duas bactérias apresentam o teste da amilase positivo, pois foi deixado o método quando se encontraram bactérias Gram positivas nos primeiros isolados em meio TS (ver subcapítulo 3.1). De acordo com Palumbo e colaboradores, as colônias positivas para α -amilase, seriam presuntivas *Aeromonas* sp. (Palumbo *et al.*, 1985). No entanto, foram também classificadas por Habsah e colaboradores *Pantoea* sp. (Habsah *et al.*, 2005), e por Baselski e colaboradores (Baselski, Upchurch and Parker, 1978) *Vibrio* sp. como bactérias produtoras de α -amilase, indo de encontro com os resultados obtidos. Foram também isoladas algumas bactérias Gram-positivo positivas à amilase, principalmente *Bacillus* sp. identificadas por métodos moleculares, mas que não foram incluídas neste estudo.

Bactérias como *Bacillus* sp., são extensamente utilizadas pela indústria pela produção de α -amilase de acordo com Sivaramakrishnan e seus colaboradores (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006). Visto isto, deixou de se utilizar este método adaptado de Palumbo e colaboradores, pois não diferenciava bactérias Gram-negativo de Gram-positivo.

O meio AMB não se revelou completamente específico para *Aeromonas* sp. Os resultados obtidos, não foram de encontro com a identificação fenotípica descrita pelo meio. Um dos problemas pode ser a descrição do meio ser selectivo para *Aeromonas hydrophila*, e também a origem da amostra, uma vez que as amostras fecais contêm além de um elevado número de bactérias, uma enorme variedade de microrganismos, que podem crescer (e cresceram) neste meio.

No teste de oxidase *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Erwinia* sp. e *Aeromonas* sp. contêm a citocromo-oxidase como parte da sua cadeia respiratória, pois tornam o reagente púrpura. Os organismos que não contêm a citocromo-oxidase, como *Buttiauxella* sp., *Pantoea* sp. e *Klebsiella* sp. da família *Enterobacteriaceae*, assim como *Stenotrophomonas* sp., *Achromobacter*

sp. e *Acetobacter* sp. não oxidam o reagente, deixando-o incolor e, por isso, são negativos para o teste de oxidase.

Segundo Rogol e Sechter (1979), *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. e *Vibrio* sp. apresentam reacção positiva para o teste oxidase (Rogol and Sechter, 1979), o que vai de encontro com os resultados conseguidos.

Bergey e colaboradores (1957) descrevem a família *Enterobacteriaceae* como oxidase negativa (Bergey *et al.*, 1957). Posteriormente, Huang e colaboradores, (Huang, Hsieh and Erickson, 2003) comprovam que a *Erwinia* sp. é oxidase positiva, apesar de se encontrar na família das Enterobactérias, o que corresponde com o resultado obtido.

Palleroni e Bradbury (1993) confirmam *Stenotrophomonas* sp. como oxidase negativa ou fracamente negativa (Palleroni and Bradbury, 1993), o que está de acordo com os nossos resultados.

No entanto, de acordo com Kadere e colaboradores (2008) *Acetobacter* sp. é oxidase negativa (Kadere *et al.*, 2008). Também Cherter e Cooper (1979) afirmam que *Achromobacter* sp. é oxidase negativa (Chester and Cooper, 1979), o que contraria os resultados obtidos.

Tabela 7: Identificação dos isolados bacterianos pela amplificação da região 16S rDNA em relação à amostra e testes fenotípicos.

	Identificação	Peixe	Meio de cultura	Oxidase	Conjunto de primers	Amplificação esperado
1	<i>Pantoea</i> sp.	Robalo	MAC	-	(Bosshard and Zbinden, 2006) (Magray et al., 2011)	796 pb 1,183 pb
2	<i>Pantoea</i> sp.	Dourada	MAC	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
3	<i>Vibrio</i> sp.	Robalo	TS 0,1% amido	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
4	<i>Pantoea</i> sp.	Robalo	TS 0,1% amido	-	(Bosshard and Zbinden, 2006) (Magray et al., 2011)	796 pb 1,183 pb
5	<i>Pseudomonas</i> sp.	Robalo	AMB	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
6	<i>Buttiauxella</i> sp.	Dourada	AMB + A *	-	(Bosshard and Zbinden, 2006) (Borrell and Acinas, 1997) (Magray et al., 2011)	796 pb 1,483 pb 1,183 pb
7	<i>Erwinia</i> sp.	Robalo	AMB + A	+	(Bosshard and Zbinden, 2006) (Borrell and Acinas, 1997) (Magray et al., 2011)	796 pb 1,483 pb 1,183 pb
8	<i>Aeromonas</i> sp.	Robalo	AMB+A	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
9	<i>Klebsiella</i> sp.	Robalo	MAC	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
10	<i>Aeromonas encheleia</i>	Robalo	AMB+A	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
11	<i>Aeromonas</i> sp.	Dourada	AMB+A	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
12	<i>Aeromonas</i> sp.	Dourada	AMB+A	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
13	<i>Aeromonas</i> sp.	Dourada	AMB	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
14	<i>Aeromonas</i> sp.	Dourada	AMB+A	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
15	<i>Buttiauxella</i> sp.	Dourada	MAC	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
16	<i>Klebsiella</i> sp.	Dourada	MAC+A *	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
17	<i>Aeromonas</i> sp.	Dourada	AMB	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
18	<i>Aeromonas</i> sp.	Dourada	AMB+A	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
19	<i>Aeromonas</i> sp.	Dourada	AMB+A	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
20	<i>Aeromonas</i> sp.	Dourada	AMB+A	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
21	<i>A. salmonicida</i>	Dourada	AMB+A	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
22	<i>A. salmonicida</i>	Dourada	AMB+A	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
23	<i>A. salmonicida</i>	Dourada	AMB	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
24	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Dourada	MAC+A	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
25	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Dourada	AMB	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
26	<i>Pseudomonas</i> sp.	Dourada	AMB	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
27	<i>Pseudomonas</i> sp.	Robalo	AMB	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
28	<i>Pseudomonas</i> sp.	Robalo	AMB	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
29	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Robalo	MAC+A	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
30	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Robalo	MAC	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
31	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Robalo	MAC	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
32	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Robalo	MAC+A	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
33	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Robalo	AMB	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
34	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Robalo	AMB	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
35	<i>Pseudomonas</i> sp.	Robalo	MAC+A	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
36	<i>Acetobacter</i> sp.	Robalo	MAC+A	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
37	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Robalo	AMB	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
38	<i>Achromobacter</i> sp.	Robalo	AMB	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
39	<i>Acetobacter</i> sp.	Robalo	AMB	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
40	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Robalo	AMB	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
41	<i>Pseudomonas</i> sp.	Robalo	AMB+A	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
42	<i>Achromobacter</i> sp.	Robalo	AMB+A	-	(Magray et al., 2011)	1,183 pb
43	<i>Pseudomonas</i> sp.	Robalo	MAC	+	(Magray et al., 2011)	1,183 pb

3.2. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

3.2.1. MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO

Na tabela 8, estão apresentados os resultados do teste de susceptibilidade com os diâmetros dos halos de inibição do crescimento das respectivas bactérias aos antibióticos testados, nomeadamente amoxicilina (AML), ácido nalidixico (NA), tetraciclina (TE), cloranfenicol (C), trimetoprim (W) e sulfametoxazol/ trimetoprim (SXT) associados aos valores das normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010) e suas respectivas concentrações. Ao medir o respectivo halo, as bactérias são classificadas como resistentes (R), intermédias (I) e susceptíveis (S). Estes antibióticos foram escolhidos como representativos de uma classe de antibióticos dos que se geralmente usam em aquacultura.

Uma limitação na análise dos resultados foi o facto de se usarem critérios baseados em estudos de bactérias de origem clínica para aferir a susceptibilidade. Os valores de referência dos halos de inibição de bacilos não fermentadores foram comparados com os valores referência dos fermentadores, assim como a sua respectiva concentração mínima inibitória (CMI). Apresentam semelhanças de inibição para alguns antibióticos. No entanto, não foi possível a comparação de todos os antibióticos testados. Apenas os fermentadores apresentam valores para todos os antibióticos testados.

Os resultados apresentados são de acordo com os valores de referência dos bacilos fermentadores, por analogia de comparação de alguns antibióticos com os bacilos não fermentadores.

Foram testadas por este método 151 bactérias isoladas nos meios MAC e AMB (ver secção anterior). Observou-se que a maiorias destes isolados era susceptível aos antibióticos testados, com halos de inibição superiores a 25-30 mm.

Foi comprovado pelos métodos moleculares que foram identificados vários géneros de bactérias, para além dos géneros esperados pelos métodos selectivos. Contudo, estas foram isoladas dos peixes, e parecem não ter sofrido pressão selectiva de antibióticos uma vez que a maioria era susceptível.

Destes 151 isolados, apenas 43 apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico (tabela 8) e dessas, apenas 14 bactérias são resistentes a apenas à amoxicilina, das quais duas *Pantoea* sp., uma *Vibrio* sp., 10 *Aeromonas* sp., e uma *Buttiauxella* sp. Duas bactérias, *Buttiauxella* sp. e *Pseudomonas* sp., apresentam resistência intermédia. Ao ácido nalidixico apresentam resistência uma *Pantoea* sp. e uma *Aeromonas* sp., enquanto que a *Klebsiella* sp. apresenta resistência intermédia a este antibiótico. Ao antibiótico trimetoprim, apenas uma *Pseudomonas* se apresenta como resistente.

Todas as bactérias apresentam susceptibilidade à tetraciclina.

No que diz respeito à resistência a diversos antibióticos, as 10 *Stenotrophomonas* sp. isoladas apresentam resistência à amoxicilina e ao trimetoprim. Contudo, algumas delas apresentam também resistência ou diminuída susceptibilidade ao cloranfenicol. Com perfil idêntico, temos duas *Acetobacter* sp. e *Achromobacter* sp. isoladas resistentes à amoxicilina e ao trimetoprim. Com resistência à amoxicilina, ao trimetoprim e resistência intermédia ao ácido nalidixico e cloranfenicol temos três enterobactérias, uma *Buttiauxella* sp., uma *Erwinia* sp. e uma *Klebsiella* sp.

As cinco *Pseudomonas* sp. apresentam resistência a vários antibióticos nomeadamente à amoxicilina, ácido nalidixico, cloranfenicol, trimetoprim, e à combinação sulfametoxazol/trimetoprim.

As restantes *Aeromonas* sp. identificadas com resistência a mais que um antibiótico, apenas apresentam resistência perante amoxicilina e trimetoprim.

Uma pesquisa feita por Ferech e colaboradores reporta que Portugal, Espanha e Grécia apresentam um aumento do uso de antibióticos ao longo dos tempos pela população, nomeadamente penicilinas, macrólidos, e cefalosporinas em maior quantidade, no ano de 2006. Em 2008, Sande-Bruinsma confirma a continuação do uso destas classes de antibióticos pelos países mencionados, re-afirmando que os β -lactâmicos são consumidos em elevados numero (Ferech *et al.*, 2006; Sande-Bruinsma, 2008).

Estudos portugueses efectuados em trutas confirmam a resistência de *Aeromonas hydrophila* a β -lactâmicos como a mais comum (Saavedra *et al.*, 2004; Sørum, 2006). No entanto, nos estudos feitos, só se identificaram as bactérias até ao género, mas os resultados afirmam que 86% da resistência apresentada é à amoxicilina.

Em Espanha, foi detectada resistência a β -lactâmicos como ampicilina e amoxicilina, tetraciclinas e sulfametoxazol/ trimetoprim em *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* spp., entre outras, em amostras de dourada. (Zorrilla *et al.*, 2003, Herrera *et al.*, 2006). Na Grécia foi reportada a presença de resistência à tetraciclina em diferentes habitats de água salgada em *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, entre outras bactérias isoladas. Os genes com resistência à tetraciclina encontrados em plasmídeos são comuns nos habitats de água salgada (Nikolakopoulou *et al.*, 2008).

Comparando com os resultados obtidos de peixes provenientes de aquacultura de Portugal, Espanha e Grécia vemos que a resistência expressa nas amostras vai de encontro

com os estudos feitos, com excepção da resistência à tetraciclina, que não foi observada neste estudo.

O género *Aeromonas* é considerado como tendo um perfil típico de susceptibilidade aos antibióticos. São considerados como intrinsecamente resistentes à ampicilina, com excepção de *A. trota*. Contudo, os isolados de *Aeromonas hydrophila* têm mostrado ser susceptíveis. Em geral, as espécies de *Aeromonas* apresentam taxas mais elevadas de resistência às penicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração (espectro estreito) e macrolídeos. Actualmente a crescente resistência a trimetoprim e sulfametoxazol, assim como quinolonas (primeira geração) tem vindo a aumentar (Carvalho, 2010).

Gu e colaboradores (2008) encontraram elevados níveis de resistência a antibióticos em *Enterobacteriaceae*, nomeadamente ampicilina, sulfametoxazol/ trimetoprim, tetraciclina e cloranfenicol em amostras clínicas (Gu *et al.*, 2008).

Nos estudos feitos, as enterobactérias *Pantoea*, *Buttiauxella* e *Klebsiella* apresentam resistência a amoxicilina, ácido nalidixico, trimetoprim, e cloranfenicol, no entanto as amostras provem de sistemas de aquacultura.

Pouca informação há sobre a resistência a *Acetobacter* sp e *Achromobacter* sp. mas podemos ver que o controlo dos antibióticos administrados aos peixes na Europa é restrito, como se reflecte na resistência encontrada em geral.

Tabela 8: Antibiograma efectuado pelo método de Kirby-Bauer das bactérias identificadas por sequenciação.

Identificação	Resultado (mm)											
	AML [10µg]	CLSI [10µg]	NA [30µg]	CLSI [30µg]	TE [30µg]	CLSI [30µg]	C [30µg]	CLSI [30µg]	W [5µg]	CLSI [5µg]	SXT [25µg]	CLSI [1,25/ 23,75µg]
<i>Pantoea</i> sp. n° 1	12	R	24	S	25	S	20	S	22	S	20	S
<i>Pantoea</i> sp. n° 2	13	R	26	S	26	S	24	S	30	S	30	S
<i>Vibrio</i> sp. n° 3	12	R	30	S	30	S	36	S	17	S	30	S
<i>Pantoea</i> sp. n° 4	17	S	11	R	24	S	22	S	30	S	20	S
<i>Pseudomonas</i> sp. n° 5	26	S	0	R	34	S	28	S	15	I	26	S
<i>Buttiauxella</i> sp. n° 6	16	I	26	S	26	S	25	S	20	S	30	S
<i>Erwinia</i> sp. n° 7	12	R	15	I	23	S	13	I	0	R	16	S
<i>Aeromonas</i> sp. n° 8	0	R	40	S	32	S	34	S	11	I	26	S
<i>Klebsiella</i> sp. n° 9	20	S	15	I	30	S	30	S	32	S	40	S
<i>A. encheleia</i> n°10	0	R	40	S	32	S	34	S	20	S	30	S
<i>Aeromonas</i> sp. n° 11	0	R	37	S	31	S	34	S	11	I	28	S
<i>Aeromonas</i> sp. n° 12	20	S	0	R	31	S	36	S	23	S	32	S
<i>Aeromonas</i> sp. n° 13	0	R	30	S	30	S	32	S	20	S	28	S
<i>Aeromonas</i> sp. n° 14	0	R	38	S	29	S	34	S	23	S	30	S
<i>Buttiauxella</i> sp. n° 15	0	R	30	S	26	S	32	S	28	S	38	S
<i>Klebsiella</i> sp. n° 16	0	R	10	R	26	S	16	I	0	R	20	S
<i>Aeromonas</i> sp. n° 17	0	R	38	S	30	S	38	S	32	S	32	S
<i>Aeromonas</i> sp. n° 18	0	R	34	S	30	S	32	S	22	S	32	S
<i>Aeromonas</i> sp. n° 19	0	R	36	S	32	S	38	S	28	S	32	S
<i>Aeromonas</i> sp. n° 20	0	R	38	S	32	S	34	S	25	S	32	S
<i>A. salmonicida</i> n° 21	0	R	34	S	30	S	32	S	13	I	30	S
<i>A. salmonicida</i> n° 22	0	R	36	S	32	S	30	S	25	S	32	S
<i>A. salmonicida</i> n°23	0	R	46	S	34	S	24	S	24	S	24	S
<i>Stenotrophomonas</i> sp. n° 24	0	R	24	S	17	S	12	R	0	R	36	S
<i>Stenotrophomonas</i> sp. n° 25	0	R	24	S	22	S	16	I	0	R	40	S
<i>Pseudomonas</i> sp. n° 26	0	R	10	R	23	S	10	R	0	R	0	R
<i>Pseudomonas</i> sp. n° 27	16	I	32	S	34	S	23	S	17	S	36	S
<i>Pseudomonas</i> sp. n° 28	9	R	19	S	29	S	24	S	0	R	22	S
<i>Stenotrophomonas</i> sp. n° 29	0	R	18	I	32	S	18	S	0	R	30	S
<i>Stenotrophomonas</i> sp. n° 30	0	R	23	S	18	S	15	I	0	R	36	S
<i>Stenotrophomonas</i> sp. n° 31	0	R	23	S	22	S	15	I	0	R	36	S
<i>Stenotrophomonas</i> sp. n° 32	0	R	27	S	20	S	16	I	0	R	30	S
<i>Stenotrophomonas</i> sp. n° 33	0	R	27	S	20	S	15	I	0	R	28	S
<i>Stenotrophomonas</i> sp. n° 34	0	R	22	S	24	S	19	S	0	R	26	S
<i>Pseudomonas</i> sp. n°35	0	R	10	R	22	S	12	R	0	R	0	R
<i>Acetobacter</i> sp. n° 36	0	R	30	S	26	S	30	S	0	R	40	S
<i>Stenotrophomonas</i> sp. n° 37	0	R	24	S	30	S	30	S	0	R	40	S
<i>Achromobacter</i> sp. n° 38	21	S	21	S	40	S	30	S	0	R	46	S
<i>Acetobacter</i> sp. n° 39	0	R	32	S	30	S	34	S	0	R	36	S
<i>Stenotrophomonas</i> sp. n° 40	0	R	24	S	21	S	30	S	0	R	36	S
<i>Pseudomonas</i> sp. n° 41	0	R	10	R	24	S	28	S	0	R	0	R
<i>Achromobacter</i> sp. n° 42	0	R	20	S	28	S	30	S	0	R	40	S
<i>Pseudomonas</i> sp. n° 43	28	S	28	S	34	S	26	S	0	R	28	S

3.3. DETECÇÃO DAS B-LACTAMASES TEM E SHV

3.3.1. COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRACÇÃO DE ADN BACTERIANO

A figura 5 evidencia o resultado do gel da comparação dos métodos de extracção de ADN *QIAmp DNA mini and Blood Mini kit* e método de fervura respectivamente em relação ao multiplex TEM e SHV.

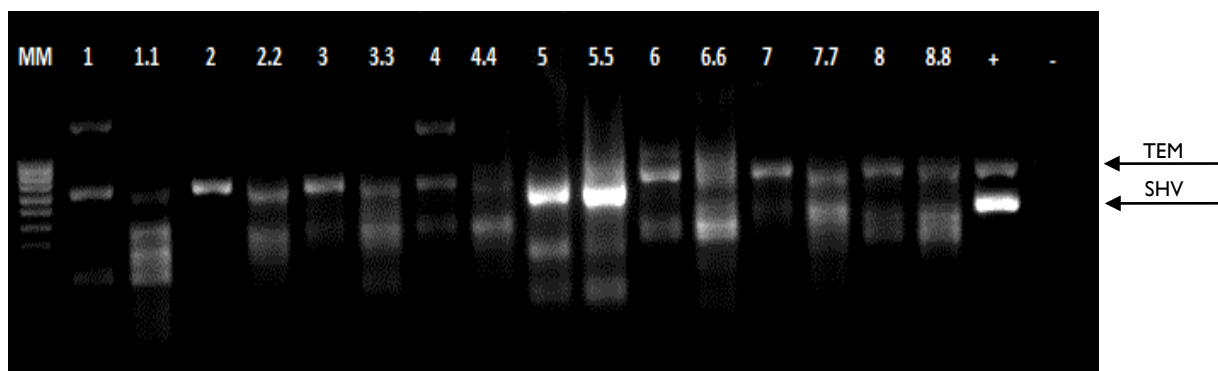


Fig. 5: Gel de prova do produto multiplex amplificado que compara os dois métodos de extracção de ADN. MM – 1.000 pb; 1, 1.1 – *Klebsiella* n° 16; 2, 2.2 – *Aeromonas encheleia* n° 10; 3, 3.3 – *Aeromonas* sp. n° 11; 4, 4.4 – *Aeromonas* sp. n° 14; 5, 5.5 – *Aeromonas* sp. n° 12; 6, 6.6 – *Pantoea* n° 2; 7, 7.7 – *Aeromonas* sp. n° 17 e 8, 8.8 – *Aeromonas* sp. n° 19. +, controlo positivo e -, negativo.

O método da Qiagen utilizado purifica o ADN das amostras para posterior PCR. Este protocolo tem sido usado com sucesso em *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi* e *Legionella pneumophila*.

Em relação aos resultados apresentados, num total, houve uma melhoria significativa nas amostras, em comparação com método de fervura utilizado.

As amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 extraídas com o *kit*, e comparando estas com as restantes 1.1, 2.2, 3.3, 4.4, 5.5, 6.6, 7.7 e 8.8, conseguem-se visualizar melhor os amplicões com menos arrastamento no gel.

3.3.2. VISUALIZAÇÃO EM GEL DOS AMPLIÇÕES DAS B-LACTAMASES: TEM E SHV

Das 37 bactérias resistentes à amoxicilina, 11 delas, após terem sido guardadas a -20 °C em meio LB com 15% de glicerol (v/v), não cresceram após descongelamento e cultivo.

Foi feito o PCR multiplex com os *primers* para os genes *bla*_{TEM} (716 pb) e *bla*_{SHV} (471 pb) nas restantes.

Os resultados do PCR com o ADN extraído pelo método da ebulição não eram satisfatórios. A resistência à amoxicilina é frequentemente associada a beta-lactamases do tipo TEM. Foi colocada a hipótese de haver inibição do PCR, purificando-se o ADN em vez de se usar o conteúdo celular. Para isso usou-se o *kit* de extracção de ADN *QIAmp DNA mini and Blood Mini kit*. Os resultados do PCR encontram-se na fig. 4. Os amplicões apresentaram os tamanhos esperados. Podemos afirmar que 24 bactérias resistentes à amoxicilina, nomeadamente, 9 *Aeromonas* sp. (nº 8, 11, 14, 17, 18, 19, 21, 22 e 23), 9 *Stenotrophomonas* sp. (nº 24, 25, 29, 30, 31, 32, 34, 37 e 40), 2 *Pseudomonas* sp. (nº 28 e 35), 1 *Pantoea* sp. (nº 2), 1 *Klebsiella* sp. (nº 16), 1 *Acetobacter* sp. (nº 36) e 1 *Achromobacter* sp. (nº 42), apresentam o amplicão referente ao gene *bla*_{TEM} e nenhuma apresenta amplicão para o gene *bla*_{SHV} para a resistência ao antibiótico β-lactâmico.

Na imagem que se segue, está um exemplo de um gel de algumas amostras que apresentam apenas o gene *bla*_{TEM} para a resistência ao antibiótico β-lactâmico associado ao respectivo número da tabela 7.

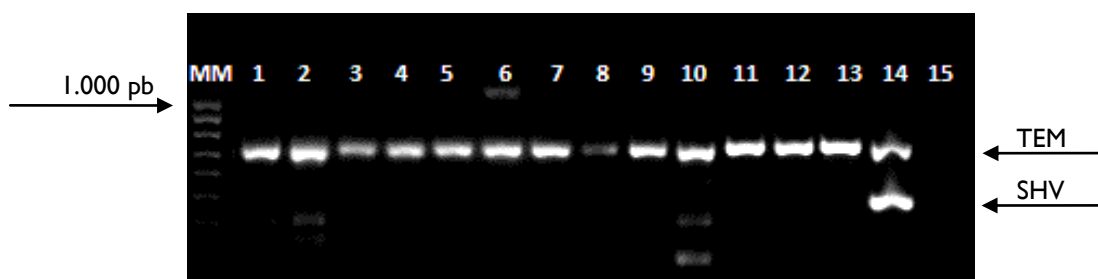


Fig. 6: Gel de prova dos produtos amplificados do PCR multiplex para os genes TEM e SHV. 1 – *Aeromonas salmonicida* n°21; 2 - *Aeromonas salmonicida* n°22; 3 – *Pseudomonas* sp. n°35; 4 – *Acetobacter* sp., n°36; 5 – *Stenotrophomonas* sp., n°24; 6 - *Stenotrophomonas* sp., n°37; 7 - *Stenotrophomonas* sp., n°40; 8 – *Stenotrophomonas* sp., n°25; 9 – *Pseudomonas* sp., n°28; 10 - *Aeromonas salmonicida*, n°23; 11 – *Achromobacter* sp., n°42; 12 - *Stenotrophomonas* sp., n°30; 13 - *Stenotrophomonas* sp. n°31. 14 – Controlo positivo; 15 – Controlo negativo.

Chikwendu e Okpokwasili (2011) detectaram em *Pseudomonas* sp. genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} (Chikwendu, Ibe and Okpokwasili, 2011). Os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} são os mais identificados em *Enterobacteriaceae* (Colom, Pe and Larin, 2003). Também os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} foram reportados em *Stenotrophomonas* sp. (Furushita et al., 2005).

O mecanismo mais comum de resistência a β -lactâmicos entre *Aeromonas* sp. é a produção de β -lactamases codificadas pelo cromossoma, como sugere Carvalho. Foram identificados outros genes cromossômicos *bla*, como *bla*_{AER-1}, numa amostra clínica de *A. hydrophila*. Também *bla*_{TEM} intimamente relacionado com *bla*_{TEM-12} numa *A. caviae* clínica. E o plasmídeo codificado com genes *bla*_{TEM-24} numa *A. caviae* e também uma estirpe de *A. hydrophila* com os genes *bla*_{TEM}, ambos recolhidos em amostras clínicas.

Recentemente um novo gene *bla*_{PER-6} foi identificado numa estirpe de *A. allosaccharophila*. E um gene TEM-I de *A. Caviae* clínica, também com um plasmídeo conjugativo. Além disso, genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} têm sido detectados em *Aeromonas* sp. a partir de diversas fontes, nomeadamente estuários e amostras clínicas, em elementos genéticos móveis (Carvalho, 2010).

3.4. ENSAIO DE CONJUGAÇÃO

3.4.1. IDENTIFICAÇÃO PELO MICROMÉTODO API NE20

O teste API NE 20 foi realizado em *Aeromonas* sp., n° 8 da tabela 7, proveniente de meio AMB com suplemento de ampicilina com o resultado 'intermédio' na classificação da susceptibilidade ao antibiótico trimetoprim e resistência à amoxicilina.

Como podemos ver na figura 2, a reacção de redução de nitratos a nitritos foi positiva, visível pela cor vermelha, pela permanência da cor, vemos que a redução de nitratos a azoto, foi negativa. Houve formação de indol a partir do L-triptofano, pela formação de cor rosa. A amarelo, no poço três, podemos ver que a bactéria fermenta a glucose. De seguida, podemos observar o resultado positivo rosa para a presença da enzima arginina DiHidrolase. E a ausência da enzima urease, pela cor amarelo. A preto, podemos observar a hidrólise da esculina, pela enzima β -glucosidase. E de seguida, a difusão do pigmento preto observado foi pela hidrólise da gelatina pela protease. A amarelo, podemos observar a hidrólise da esculina pela enzima β -galactosidase. E de seguida, os poços em que se vê as linhas turvas, nomeadamente GLU, ARA, MNE, MAN, NAG, MAL, GNT, CAP, MLT e CIT, são positivos para assimilação de glucose, arabinose, manose, manitol, N-acetil-Glucosamina, maltose, potássio gluconato, ácido caprato, malato e citrato de trisódio, respectivamente. Associado ao teste anteriormente feito e positivo para oxidase, dá um resultado de 90% de identificação para *Aeromonas hydrophila/caviae*.



Fig. 7: Resultado do teste API NE 20 para *Aeromonas* n°8

3.4.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA POR E-TESTE

A determinação da concentração mínima inibitória foi realizada a fim de se saber a concentração mínima dos antibióticos que inibiam a *Aeromonas* sp n°8., para adicionar ao meio de cultura para o ensaio da conjugação. Esta bactéria foi escolhida por apresentar resistência possível de ser transferida, segundo o valor do halo de inibição de trimetoprim mais baixo (11mm) e de amoxicilina (0mm).

O resultado do E-teste para o trimetoprim foi 4 mg/L, como mostra na figura 3. E o resultado para a ampicilina foi de 25 mg/L.

A ampicilina e a amoxicilina apresentam o mesmo mecanismo de acção perante as Gram-negativas. A amoxicilina é um análogo da ampicilina (Livermore and Williams, 1996)



Fig. 8: Concentração mínima inibitória para o trimetoprim determinada pelo E-teste para o isolado *Aeromonas hydrophila/caviea*

Comparando, os resultados por ambos os testes, vemos que a resistência apresentada pelo halo de inibição (0 mm) vai de encontro com o E-teste. No entanto, o E-teste dá-nos um resultado quantitativo, ou seja a partir de 25 mg/L de ampicilina é que há inibição do crescimento de *Aeromonas* sp., ao contrário do resultado dado pela visualização do disco que apenas nos diz que a bactéria é resistente à amoxicilina.

3.4.3. VISUALIZAÇÃO EM GEL DO PLASMÍDEO

Dos métodos testados, apenas o método de Birnboim e Doly adaptado é que apresentou resultados positivos, como podemos ver na imagem que se segue. A amostra foi sujeita ao crescimento com e sem disco de antibiótico para ver se o plasmídeo era expressado ou não. A adição de antibiótico não alterou a sua expressão.

Não foi possível quantificar com exactidão o tamanho do amplicão, mas pode-se afirmar que apresenta um tamanho acima dos 10.000 pb.

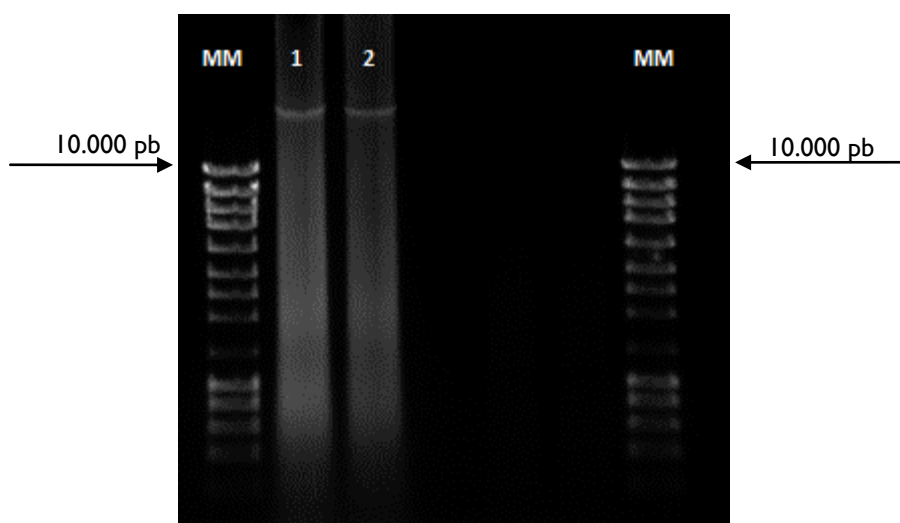


Fig. 9: Gel de prova da presença de plasmídeo em *Aeromonas* sp. do meio AMB com suplemento de ampicilina isolada de um robalo.
1 – amostra proveniente de meio com trimetoprim; 2 – amostra proveniente de meio sem antibiótico.

De acordo com Carvalho (2010), foram encontrados diferentes plasmídeos em *Aeromonas* sp. (Carvalho, 2010). O seu tamanho pode variar entre 300 pb e 2.400 kb (Aarestrup, 2006). Contudo observa-se que o plasmídeo extraído de *Aeromonas* sp. n° 8 tem um tamanho superior a 1kb.

Plasmídeos com resistência a ampicilina e tetraciclina (Son *et al.*, 1997) e com resistência ao ácido nalidixico (Majumdar *et al.*, 2011) e genes de resistência em plasmídeos R em *Aeromonas salmonicida* e *Aeromonas hydrophila* foram encontrados em Inglaterra, Japão, França e Irlanda (Sørum, 2006). Também plasmídeos encontrados em *Enterobacteriaceae* com β -lactamases AmpC parecem derivar de *Aeromonas* sp. (Carvalho, 2010).

3.4.4. CONJUGAÇÃO

Os ensaios de conjugação de *A. hydrophila/caviae* nº8 com a célula receptora *E. coli* J53 não mostraram a obtenção de transconjugantes. Este resultado sugere que o plasmídeo não é conjugativo, contudo não é rejeitada a possibilidade dos determinantes e resistência à amoxicilina e trimetoprim se encontrarem no plasmídeo. Num estudo, na truta arco iris, foi evidenciada a conjugação com plasmídeos portadores de resistência a oxitetraciclina, sulfonamidas, trimetoprim e estreptomicina (Sørum, 2006). Também Picão e colaboradores (2008) testaram, com sucesso, a transferência de plasmídeos com 70 kb com resistência através de conjugação de uma *Aeromonas media* para uma *Escherichia coli* J53 (Picão et al., 2008).

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSÕES

Dos resultados deste estudo retiram-se as seguintes conclusões:

A maioria das bactérias Gram-negativo (72%) isoladas dos robalos e douradas de Portugal, Grécia e Espanha apresenta susceptibilidade à amoxicilina, ácido nalidixico, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprim e trimetoprim/ sulfametoxazol.

- Das 151 bactérias isoladas, apenas 43 bactérias (28%) apresentam resistência. Dessa resistência, concluímos que 86% pertence à amoxicilina, seguido de 58% de resistência ao trimetoprim, 23% ao ácido nalidixico, 21% ao cloranfenicol, apenas 7% de resistência ao sulfametoxazol/ trimetoprim e apresentam susceptibilidade à tetraciclina.

- Esta resistência observou-se em 30% de *Aeromonas* sp, 23% em *Stenotrophomonas* sp., 19% em Enterobactérias (*Pantoea* sp., *Buttiauxella* sp, *Klebsiella* sp. e *Erwinia* sp.) 16% em *Pseudomonas* sp., 5% em *Acetobacter* sp. e 5% em *Achromobacter* sp. e 2% em *Vibrio* sp.

- Dos oito robalos estudados foram isoladas 25 bactérias resistentes e das seis douradas foram isoladas 18.

Podemos concluir que os robalos e douradas de aquacultura oriundos de Portugal, Grécia e Espanha disponíveis ao consumidor final não apresentam bactérias com elevada taxa de resistência aos antibióticos. Para isso poderá contribuir o controlo mais estrito da administração de antibióticos em produção animal nos países da EU, e o cumprimento da legislação.

No entanto, é de salientar a importância da monitorização dos antibióticos administrados aos animais de consumo assim como estudos continuados da avaliação da resistência por parte de bactérias patogénicas e da possível transferência da resistência para outras bactérias.

CAPÍTULO V

5. ANEXOS

Tabela 9: Ocorrência e concentrações médias de resíduos dos principais antibióticos veterinários em diferentes matrizes ambientais. Adaptado de Regitano and Leal, 2010.

Pharmacologic group	Antibiotic	Medium concentration	Matrix	Local
β-lactam	Amoxicillin	< 10 ng/L	Surface water	Northwest Germany
	Piperacillin	Until 15 ng/L	Surface water	Northwest Germany
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	0,28 µg/Kg	Animal droppings	United Kingdom
		5 ng/L	Surface water	Northwest Germany
	Enrofloxacin	2,8 mg/Kg	chicken droppings	Austria
Macrolides	Azithromycin	Until 13ng/L	Surface water	Northwest Germany
	Clarithromycin	Until 20ng/L	Surface water	Northwest Germany
	Clindamycin	Until 30ng/L	Surface water	Northwest Germany
	Erythromycin	Until 300ng/L	Surface water	Northwest Germany
		Until 1.70 µg /L	Surface water	Germany
	Roxithromycin	Until 30ng/L	Surface water	Northwest Germany
	Tylosin	90ng/L	Surface water	Northwest Germany
	Lincomycin	8.5 µg/Kg	Soil	United Kingdom
21.1 µg/L		Surface water	United Kingdom	
Sulfonamides	Trimetoprim	Until 71 ng/L	Surface water	Northwest Germany
		Until 0.20 µg/L	Surface water	Germany
		Until 17mg/Kg	Chicken droppings	Austria
		0.5 µg/Kg	Soil	United Kingdom
Sulfonamides	Sulfamethoxazole	Until 98 ng/L	Surface water	Northwest Germany
		0.22 µg/L	Ground water	EUA
		1.02 µg/L	Surface water	EUA
		0.47 µg/L	Ground water	Germany
	Sulfadimetoxin	0.06-15 µg/L	Surface water	EUA
		390 µg/Kg	Bovine droppings	Italy
	Sulfametazin	0.22 µg/L	Surface water	EUA
		0.16 µg/L	Ground water	Germany
		2 µg/Kg	Soil	Germany
	Sulfathiazole	1.2mg/Kg	Maize	EUA
	Sulfadiazine	0.08 µg/Kg	Surface water	EUA
		51mg/Kg	Chicken droppings	Austria
	91mg/Kg	Turkey droppings		
Tetracyclines	Chlortetracycline	0.15 µg/L	Surface water	EUA
		4.6 – 7.3 µg/Kg	Soil	North Germany
		Until 46 mg/Kg	Swine droppings	Austria
	Oxytetracycline	0.07 – 1.34 µg/L	Surface water	EUA
		71.7 µg/L	Runoff	England
		27 µg/Kg	Soil	Northwest Germany
	Until 29 mg/Kg	Swine droppings	Austria	

CAPÍTULO VI

6. BIBLIOGRAFIA

- AARESTRUP, F. M. - **The origin, evolution, and local and global dissemination of antimicrobial resistance.** In AARESTRUP, F. M. - Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, DC, USA: ASM Press, 2006. p. 339-360.
- ADAMS, R.; FARBER, L.; LERKE, P. - **Bacteriology of spoilage of fish muscle.** Applied Microbiology. 12:3 (1964) 277-279.
- AUSTIN, B. - **The bacterial microflora of fish, revised.** TheScientificWorldJournal. 6 (2006) 931-45.
- BAERE, T. De *et al.* - **Isolation of *Buttiauxella gaviniae* from a Spinal Cord Patient with Urinary Bladder Pathology.** Journal of Clinical Microbiology. 40:10 (2002) 3867-3870.
- BARCELLOS, L. *et al.* - **Aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos.** B. Inst. Pesca. São Paulo, 34:3 (2008) 355-363.
- BASELSKI, V. S.; UPCHURCH, S.; PARKER, C. D. - **Isolation and phenotypic characterization of virulence-deficient mutants of *Vibrio cholerae*.** Infection and Immunity. 22:1 (1978) 181-188.
- BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified. (2011).** Instructions for use - ready to use plated media. Germany.
- BERGEY, D. *et al.* - **Bergey's manual of determinative bacteriology.** (1957). ISBN 0-683-07893-3
- BONNET, R. - **Growing Group of Extended-Spectrum B -Lactamases: the CTX-M Enzymes.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48:1 (2004).
- BORRELL, N.; ACINAS, S. - **Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes.** Journal of Clinical Microbiology. 35:7 (1997) 1671-4.
- BOSSHARD, P.; ZBINDEN, R. - **rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory.** Journal of ClinicalMicrobiology. 44:4 (2006) 1359-1366.
- BURRIDGE, L. *et al.* - **Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects.** Aquaculture. 306:1-4 (2010) 7-23.
- CABELLO, F. C. - **Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment.** Environmental Microbiology. 8:7 (2006) 1137-44.
- CALLISTER, S. M.; AGGER, W. A - **Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce.** Applied and Environmental Microbiology. 53:2 (1987) 249-53.
- CANTAS, L.; FRASER, T. - **The culturable intestinal microbiota of triploid and diploid juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) - a comparison of composition and drug resistance.** BMC Veterinary Research. 7:1 (2011) 71.
- CANTAS, L.; MIDTLYNG, P. J.; SØRUM, H. - **Impact of antibiotic treatments on the expression of the R plasmid tra genes and on the host innate immune activity during pRAS1 bearing *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish (*Danio rerio*).** BMC Microbiology. 12:1 (2012) 37.
- CARVALHO, M. J. *et al.* - **Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption.** International Journal of Food Microbiology. 159:3 (2012) 230-9.
- CARVALHO, M. J. M. - **Diversity of *Aeromonas* species from different environments in Portugal.** Universidade de Aveiro, 2010.
- CHATTERJEE, A K.; STARR, M. P. - **Transfer among *Erwinia* spp. and other enterobacteria of antibiotic resistance carried on R factors.** Journal of Bacteriology. 112:1 (1972) 576-84.

CHESTER, B.; COOPER, L. H. - **Achromobacter Species (CDC Group Vd): Morphological and Biochemical Characterization.** Journal of Clinical Microbiology. 9:3 (1979) 425-436.

CHIKWENDU, C. I.; IBE, S. N.; OKPOKWASILI, G. C. - **Detection of blaSHV and blaTEM beta-lactamase genes in multi-resistant Pseudomonas isolates from environmental sources.** African Journal of Microbiology Research. 5:15 (2011) 2067-2074.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2010) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Information Supplement. 29, 40-46.

COENYE, T. - **Achromobacter insolitus sp. nov. and Achromobacter spanius sp. nov., from human clinical samples.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53:6 (2003) 1819-1824.

COLOM, K.; PE, J.; LARIN, E. - **Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, blaSHV and blaOXA-1 genes in Enterobacteriaceae.** FEMS Microbiology Letters. 223: (2003) 147-151.

DAILY, O.; JOSEPH, S. - **Association of Aeromonas sobria with human infection.** Journal of Clinical Microbiology. 13:4 (1981) 769-777.

DECRETO-LEI n.º 314/2009. "D. R. 1ª série N.º 209" (2009-10-28).

DEODHAR, L. P.; SARASWATHI, K.; VARUDKAR, A - **Aeromonas spp. and their association with human diarrheal disease.** Journal of Clinical Microbiology. 29:5 (1991) 853-6.

EFSA; ECDC - **The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in Antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans , animals and food in 2011.** EFSA Journal. 11:5 (2013).

FAO - **Aquaculture topics and activities** [Em linha], atual. 2013. [Acedido a 28 jan. 2013]. Disponível em <http://www.fao.org/fishery/topic/13542/en>.

FAO, F. - **The state of world fisheries and aquaculture** [Em linha]. Rome : [s.n.]. 209 p. [Acedido a 29 jan. 2013]. Disponível em <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:The+state+of+world+fisheries+and+aquaculture#0>. ISBN 9789251072257.

FERECH, M. *et al.* - **European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 58: (2006) 401-407.

FRENEY, J. *et al.* - **Susceptibilities to antibiotics and antiseptics of new species of the family Enterobacteriaceae.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 32:6 (1988) 873-6.

FURUSHITA, M. *et al.* - **Isolation of Multidrug-Resistant Stenotrophomonas maltophilia from Cultured Yellowtail (Seriola quinqueradiata) from a Marine Fish Farm.** Applied and Environmental Microbiology. 71:9 (2005) 9-12.

GAVINI, F. *et al.* - **Transfer of Enterobacter agglomerans (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to Pantoea gen. nov. as Pantoea agglomerans comb. nov. and Description of Pantoea dispersa sp. nov.** International Journal of Systematic Bacteriology. 39: (1989) 337-345.

GHENGHESH, K.; AHMED, S. - **Aeromonas-associated infections in developing countries.** Infect Developing Countries. 2: (2008) 81-98.

GORDON, L. *et al.* - **Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms.** Journal of Applied Microbiology. 102:4 (2007) 1167-76.

GOUBY, A. *et al.* - **Acetobacter cibinongensis Bacteremia in Human Risk for Epidemics after Natural Disasters.** Emerging infectious diseases. 13:5 (2007) 5-6.

GRIGORAKIS, K.; RIGOS, G. - **Aquaculture effects on environmental and public welfare - the case of Mediterranean mariculture.** Chemosphere. 85:6 (2011) 899-919.

- GU, B. *et al.* - **Novel cassette arrays of integrons in clinical strains of Enterobacteriaceae in China.** International Journal of Antimicrobial Agents. 32:300 (2008) 529-533.
- GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. - **Princípios da Utilização Prudente e Racional de Antimicrobianos em Animais.** Guia de Antimicrobianos em Veterinária. (2010) p. 17-30.
- HABSAH, H. *et al.* - **An outbreak of *Pantoea* spp . in a neonatal intensive care unit secondary to contaminated parenteral nutrition.** Journal of Hospital Infection. 61 (2005) 213-218.
- HANDFIELD, M.; SIMARD, P.; LETARTE, R. - **Differential Media for Quantitative Recovery of Waterborne *Aeromonas hydrophila*.** Applied and Environmental Microbiology. 62:9 (1996) 3544-3547.
- HERNOULD, M. *et al.* - **Role of the *AheABC* efflux pump in *Aeromonas hydrophila* intrinsic multidrug resistance.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 52:4 (2008) 1559-63.
- HERRERA, F. C. *et al.* - **Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain.** Journal of Applied Microbiology. 100:3 (2006) 527-36.
- HEUER, O. E. *et al.* - **Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture.** Clinical infectious diseases. 49:8 (2009) 1248-53.
- HIRSCH, R. *et al.* - **Occurrence of antibiotics in the aquatic environment.** The Science of the total environment. 225:1-2 (1999) 109-18.
- HUANG, H. C.; HSIEH, T. F.; ERICKSON, R. S. - **Biology and Epidemiology of *Erwinia rhapontici*, Causal Agent of Pink Seed and Crown Rot of Plants.** Plant Pathology Bulletin. 12:16 (2003) 69-76.
- JACOBS, L.; CHENIA, H. Y. - **Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems.** International Journal of Food Microbiology. 114:3 (2007) 295-306.
- JIANG, H. *et al.* - **Prevalence and characteristics of b-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 67: (2012).
- KADERE, T. T. *et al.* - **Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (*mnazi*).** African Journal of Microbiology. 7:16 (2008) 2963-2971.
- KIM, N. H. *et al.* - **Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes and ciprofloxacin resistance in pediatric bloodstream isolates of *Enterobacteriaceae* over a 9-year period.** Japanese journal of infectious diseases. 66:2 (2013) 151-4.
- KOCSIS, B. *et al.* - **Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* strains isolated in North-East Italy.** Antimicrobial Original Research Paper. 21: (2013) 36-40.
- KÜMMERER, K. - **Resistance in the environment.** The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 54:2 (2004) 311-20.
- LEES, P.; SHOJAEI ALIABADI, F. - **Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans.** International Journal of Antimicrobial Agents. 19:4 (2002) 269-84.
- LESTON, S. *et al.* - **The veterinary drug and environmental.** In BORGEARO, R. S. (Ed.) - Animal Feed: Types, Nutrition and Safety. [S.l.] : Nova Science Publishers, Inc., 2011. ISBN 9781612093468. p. 61-83.
- LIVERMORE, D. M.; WILLIAMS, J. D. - **B-Lactams: Mode of Action and Mechanisms of Bacterial Resistance.** In Antibiotics in laboratory medicine. fourth ed. ISBN 0683051695. p. 502-578.
- LOBITZ, B. *et al.* - **Climate and infectious disease: use of remote sensing for detection of *Vibrio cholerae* by indirect measurement.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 97:4 (2000) 1438-43.
- LYNCH, J. P.; CLARK, N. M.; ZHANEL, G. G. - **Evolution of antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* (focus on extended spectrum b-lactamases and carbapenemases).** (2013) 199-210.

- MACHADO, E. *et al.* - **Commensal Enterobacteriaceae as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and sul genes in Portugal.** *Frontiers in Microbiology*. 4: (2013) 1-7.
- MAGRAY, M. *et al.* - **Identification of *Escherichia coli* through analysis of 16S rRNA and 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region sequences.** *Bioinformation*. 6:10 (2011) 370-1.
- MAJUMDAR, T. *et al.* - **Complete nucleotide sequence of a quinolone resistance gene (qnrS2) carrying plasmid of *Aeromonas hydrophila* isolated from fish.** *Plasmid*. 66:2 (2011) 79-84.
- MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. - **Food animals and antimicrobials: impacts on human health.** *Clinical microbiology reviews*. 24:4 (2011) 718-33.
- MCEWEN; M., A. F.; DAVID, J. - **Monitoring of antimicrobial resistance in animals: principles and practices.** In FRANK M. WASHINGTON (Ed.) - *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.* Washington, D. C. : [s.n.]. p. 397-413.
- MENDONÇA, N. *et al.* - **Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51:6 (2007) 1946-55.
- MIRANDA, C.; KEHRENBURG, C. - **Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms.** *Antimicrobial agents and Chemoterapy*. 47:3 (2003) 883-888.
- MUCHLISIN, Z. A. - **Aquaculture.** Croatia : Intech, 2012. 1-400 p. ISBN 9789533079745.
- MÜLLER, H. E. *et al.* - **Emended description of *Buttiauxella agrestis* with recognition of six new species of *Buttiauxella* and two new species of *Kluyvera*: *Buttiauxella ferragutiae* sp. nov., *Buttiauxella gaviniae* sp. nov., *Buttiauxella brennerae* sp. nov., *Buttiauxella izardii* sp.** *International journal of systematic bacteriology*. 46:1 (1996) 50-63.
- NESTED, E. W. *et al.* - **Antimicrobial Medicine.** In TERRANCE, S. (Ed.) - *Microbiology - A human perspective*. 2nd. ed. ISBN 0697286029. p. 447-470.
- NESTED, E. W. *et al.* - **Baterial genetics.** In TERRANCE, S. (Ed.) - *Microbiology - A human perspective*. ISBN 0697286029. p. 167-180.
- NIKOLAKOPOULOU, T. L. *et al.* - **Prevalence of tetracycline resistance genes in Greek seawater habitats.** *The Journal of Microbiology*. 46:6 (2008) 633-640.
- NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. - **Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*.** *Emerging Infectious Diseases*. 17:10 (2011) 1791-8.
- OLIVEIRA, M. C. *et al.* - **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase.** Embrapa Pe ed. ISBN 9788586764127.
- ONLINE EDUCATION RESORCES - **MacConkey's Agar - Differential and selective bacterial grown medium** [Em linha], atual. 2013. [Acedido a 29 de Maio 2013] Disponível em <http://www.scienceprofonline.com/microbiology/macconkeys-agar-mac-differential-selective-bacterial-growth-medium.html>>.
- OVERMAN, T. L. - **Antimicrobial Susceptibility of *Aeromonas hydrophila*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 17:4 (1980) 612-614.
- PABLOS, M. *et al.* - **Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors.** *International Journal of Food Microbiology*. 135:2 (2009) 158-64.
- PALLERONI, N.; BRADBURY, J. - ***Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for *Xanthomonas*.** *International Journal of Systematic Bacteriology*. 43: (1993) 606-609.
- PALUMBO, S. A. *et al.* - **Starch-Ampicillin Agar for the Quantitative Detection of *Aeromonas hydrophila*.** *Applied and environmental microbiology*. 50:4 (1985) 1027-30.

PATERSON, D. L. - **Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae.** American journal of infection control. 34:5 Suppl 1 (2006) S20-8; discussion S64-73.

PICÃO, R. C. *et al.* - **Expanded-spectrum beta-lactamase PER-1 in an environmental *Aeromonas media* isolate from Switzerland.** Antimicrobial agents and chemotherapy. 52:9 (2008) 3461-2.

PICÃO, R. C. *et al.* - **The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp . and Enterobacteriaceae in sewage.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. (2013) 1-6.

POWLEDGE, T. M. - **The polymerase chain reaction.** AJP: Advances in Physiology Education. 28:2 (2004) 44-50.

PRESS, C. M.; LILLEHAUG, A - **Vaccination in European salmonid aquaculture: a review of practices and prospects.** The British veterinary journal. 151:1 (1995) 45-69.

READ, P.; FERNANDES, T. - **Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe.** Aquaculture. 226:1-4 (2003) 139-163.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. - **Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira.** Revista Brasileira de Ciência do Solo. 34:3 (2010) 601-616.

REGULAMENTO (CE) N.º 2073/2005. Jornal Oficial da União Europeia. (2005-11-15).

REGULAMENTO (CEE) n.º 2377/90. (1990-08-18). 224.

RODRÍGUEZ-BLANCO, A. - **Integrating conjugative elements as vectors of antibiotic, mercury, and quaternary ammonium compound resistance in marine aquaculture environments.** Antimicrobial agents and Chemoterapy. (2012) 2619-2626.

ROGOL, M.; SECHTER, I. - **Pril-xylose-ampicillin agar, a new selective medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*.** Journal of medical genetics 12:June 1978 (1979) 229-231.

ROMERO, J.; FEIJOÓ, C.; NAVARRETE, P. - **Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives; Health and Environment in Aquaculture.** In CARVALHO, E. (Ed.) - **cdn.intechopen.com** [Em linha] [Acedido a 11 jan. 2013]. Disponível em http://cdn.intechopen.com/pdfs/35141/InTech-Antibiotics_in_aquaculture_use_abuse_and_alternatives.pdf. ISBN 978-953-51-0497-1

ROSENBLATT, J. E. - **Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria.** In VICTOR LORIAN (Ed.) - Antibiotics in laboratory medicine. 4th ed. ed. ISBN 0683051695. p. 112-126.

SAAVEDRA, M. J. *et al.* - **Resistance to beta-lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology. 7:3 (2004) 207-11.

SABAT, G. *et al.* - **Selective and Sensitive Method for PCR Amplification of Escherichia coli 16S rRNA Genes in Soil** **Selective and Sensitive Method for PCR Amplification of Escherichia coli 16S rRNA Genes in Soil.** Applied and environmental microbiology. 66:2 (2000).

SANDE-BRUINSMA, N. Van De - **Antimicrobial drug use and resistance in Europe.** Emerging infectious disease. 14:11 (2008).

SCIENCEBLOGS - **Resistência bacteriana** [Em linha], atual. 2009. [Acedido a 7 abr. 2013]. Disponível em http://scienceblogs.com.br/eccemedicus/2009/06/resistencia_bacteriana/.

SCIENTIFIC, T. F. - **Aeromonas Medium Base (Ryan)** [Em linha], atual. 2001. [Acedido a 1 de Maio 2013]. Disponível em http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0833&org=2&c=UK&lang=EN.

SIVARAMAKRISHNAN, S. *et al.* - **α -Amylases from Microbial Sources – An Overview on Recent Developments.** Food Technol. Biotechnol. 44:2 (2006) 173-184.

SMITH, Peter R. *et al.* (2008). **Guidelines for antimicrobial use in aquaculture.** In L. B. J. and H. K. Luca Guardabassi (Ed.), Guide to antimicrobial use in animals. (Blackwell., pp. 207– 218).

SON, R. *et al.* - **Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, *Telapia (Telapia mossambica)*.** Letters in Applied Microbiology. 24 (1997) 479-482.

SØRUM, H. - **Antimicrobial Drug Resistance in Fish Pathogens.** In AARESTRUP, F. M. (Ed.) - Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, D. C. : [s.n.]. p. 213-237.

STONE, N. D. *et al.* - **Comparison of disk diffusion, VITEK 2, and broth microdilution antimicrobial susceptibility test results for unusual species of *Enterobacteriaceae*.** Journal of clinical microbiology. 45:2 (2007) 340-6. doi: 10.1128/JCM.01782-06.

STOVER, C. K. *et al.* - **Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAOI, an opportunistic pathogen.** Nature. 406:6799 (2000) 959-64.

STRATTON IV, C. W. - **Mechanisms of action for antimicrobial agents: General principles and mechanisms for selected classes of antibiotics.** In LORIAN, V. (Ed.) - Antibiotics in laboratory medicine. 4th ed. ed. ISBN 0683051695. p. 579-603.

TAVECHIO, W.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. - **Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura.** sp.gov.br. 35:2 (2009) 335-341.

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A. - **Effects on mortality and stress response in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), fed mannan oligosaccharides (MOS) after *Vibrio anguillarum* exposure.** Journal of fish disease. 2012) 591-602.

TRCEK, J.; TEUBER, M. - **Genetic and restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria.** FEMS microbiology letters. 208:1 (2002) 69-75.

VIEIRA, R. H. S. D. F. *et al.* - **Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and pond environment in northeastern Brazil.** Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes. 45:3 (2010) 198-203.

YAGOUB, S. O. - **Isolation of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. from raw fish sold in fish market in Khartoum state.** Journal of bacteriology Research. 1:7 (2009) 85-88.

ZORRILLA, I. *et al.* - Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain. **Aquaculture.** 218: (2003) 11-20.